

Monitorização da conservação de pêra ‘Rocha’: avaliação de características de qualidade

Cristiana Lucas Pereira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos

Orientadora: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Técnica Superior do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

O desenvolvimento deste trabalho não seria possível sem o apoio de diversas pessoas e entidades que foram essenciais para que eu conseguisse realizá-lo.

Agradeço em especial à minha orientadora Doutora Mariana Mota, por todos os ensinamentos, pela dedicação, carinho e disponibilidade para me ajudar no decurso deste trabalho.

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo projecto RMPPrA-PeRA, financiado pela empresa IEQUALTECS e pelo Programa Operacional Regional do Centro: CENTRO-01-0247-FEDER-010959, Portugal 2020, e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através da unidade de investigação LEAF - Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (UID/AGR/04129/2013), a quem agradeço.

À IEQUALTECS, que forneceu os materiais vegetais, provenientes da central CPF, sem a qual não era possível a realização deste estudo.

À secção de Hortofruticultura e Viticultura do ISA, onde realizei todas as análises que proporcionaram a realização deste trabalho.

Ao Santander – Totta e Instituto Superior de Agronomia, os quais contribuíram para a minha formação, através do prémio que me foi atribuído: Prémio de Incentivo ao Mestrado Santander-Totta/Instituto Superior de Agronomia.

Aos meus pais, irmãos e namorado pelos conselhos, amizade e apoio, essenciais durante todo este percurso.

Agradeço também a todos aqueles que directa ou indirectamente, me ajudaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Foi estudado o comportamento das características de qualidade da pêra 'Rocha' ao longo do armazenamento em atmosfera controlada (AC) dinâmica (0, 57, 99, 158 e 190 dias). Para cada período de armazenamento, fizeram-se análises à saída da câmara e após 7 e 14 dias à temperatura de 9°C (20°C para os dois últimos lotes).

Para tal, foram analisados lotes de 15 frutos para cada momento, provenientes de dois pomares distintos, do Bombarral e de Mafra, na campanha de 2016. Estes foram conservados imediatamente em regime de AC dinâmica (0,5% O₂ e 0,5% CO₂), a -0,5°C, HR= 90 a 95 %. Os parâmetros avaliados foram: firmeza (kg/0,5cm²), teor de sólidos solúveis (TSS, °Brix), Acidez titulável (g/L), teor de fenóis totais (mg/L), teor de vitamina C (mg/L) e uma medição indirecta das actividades das enzimas PPO e ADH. Foi também avaliada a incidência de acastanhamento interno e a existência de alguma relação com os parâmetros analisados. A qualidade das peras manteve-se ao longo do armazenamento, verificando-se globalmente uma evolução pouco significativa dos valores médios obtidos para as actividades de ADH, PPO e teores de fenóis, vitamina C e firmeza. Verificou-se um ligeiro aumento do TSS médio e um decréscimo da AT média. Com o aumento do tempo de prateleira, concluiu-se que a firmeza diminuiu significativamente, o TSS médio e a AT média não apresentaram variações relevantes, excepto nos dois últimos lotes, onde se verificou o aumento mais significativo do TSS aos 14 dias. O teor de fenóis médio e actividade indirecta da ADH pouco variaram durante os 14 dias; a actividade indirecta da PPO aumentou nos dois últimos lotes, coincidindo com a diminuição da vitamina C também nestes lotes. O acastanhamento interno incidiu em maior percentagem nos lotes com 190 dias de armazenamento, não existindo nenhuma relação significativa com os parâmetros bioquímicos.

Palavras-chave: pêra 'Rocha', atmosfera controlada, parâmetros de qualidade, acastanhamento interno, tempo de armazenamento

Abstract

The evolution of 'Rocha' pear quality parameters was studied during long-term storage in dynamic controlled atmosphere (0, 57, 99, 158 and 190 days). For each date, analyses were conducted immediately after exit from storage facility, and after 7 and 14 days at temperature 9°C (20°C for the last two sets).

Sets of 15 fruits were analysed for each moment, derived from two different orchards, Bombarral and Mafra, in the harvest of 2016. Pears were stored immediately under a dynamic controlled atmosphere (0,5% O₂ and 0,5% CO₂), at -0.5 °C, HR = 90 to 95%. The parameters evaluated were: firmness (kg/0.5cm²), soluble solids content (SST, °Brix), titratable acidity (TA, g/L), total phenol content (mg/L), vitamin C content (mg/L) and an indirect measurement of the activities of the PPO and ADH enzymes. The incidence of internal browning was also evaluated and related to the analyzed parameters.

The quality of the pears was maintained throughout the storage, with a slight evolution of the average values obtained for the activities of ADH, PPO and phenols, vitamin C and firmness. There was a slight increase in mean SST and a decrease in mean TA. Upon the increase of shelf life, the firmness decreased significantly, mean SST and mean TA did not show any relevant variations, except in the last two sets, which presented the most significant increase in SST at 14 days. The mean phenolic content and indirect ADH activity varied little during the 14 days; the indirect PPO activity increased in the last two sets, in agreement with the decrease in vitamin C, also in these sets. The internal browning had a higher percentage in the sets with 190 days of storage, and there was no significant relation with the biochemical parameters.

Keywords: 'Rocha' pear, controlled atmosphere, quality parameters, internal browning, storage time.

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice de figuras.....	vii
Índice de quadros.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
ENQUADRAMENTO TEÓRICO	1
1.Introdução/objectivos.....	1
2. A pêra.....	4
2.1 Produção e comercialização.....	4
2.2 Características nutricionais.....	6
3. Fisiologia pós-colheita da pêra ‘Rocha’: principais aspectos pós-colheita.....	8
3.1 Respiração e produção de etileno.....	8
3.2 A pêra: fruto climatérico.....	9
4. Armazenamento pós-colheita em condições de atmosfera controlada.....	11
4.1 Objectivos a atingir no armazenamento e abordagens mais frequentes.....	11
4.2 Acastanhamento interno.....	12
4.2.1 Desenvolvimento e sintomas.....	12
4.2.2 Causas Possíveis	13
4.2.2.1 Escurecimento enzimático.....	13
4.2.2.2 <i>Stress</i> oxidativo.....	16
4.2.2.3 Sistema antioxidante.....	16
4.2.2.4 Metabolismo fermentativo.....	18
4.3 Evolução de parâmetros que contribuem para a qualidade.....	21
4.3.1 Firmeza.....	22
4.3.2 Vitamina C.....	23

4.3.3 Teor de Sólidos Solúveis	24
4.3.4 Fenóis.....	25
4.3.5 Acidez.....	25
DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	27
5. Materiais e métodos	27
5.1 Material vegetal e datas de análise.....	27
5.2 Métodos analíticos	27
5.2.1 Determinação da firmeza.....	28
5.2.2 Acidez Titulável (AT)	28
5.2.3 Teor de fenóis totais.....	28
5.2.4 Teor de Sólidos Solúveis (TSS)	28
5.2.5 Vitamina C (Ácido ascórbico)	28
5.2.6 Quantificação de proteína solúvel total.....	29
5.2.7 Determinação indirecta de actividade da PPO.....	29
5.2.8 Determinação indirecta de actividade da ADH.....	29
5.2.9 Acastanhamento interno.....	30
5.3 Análise de dados: métodos estatísticos	30
6.Resultados e discussão.....	31
6.1 Evolução dos parâmetros de qualidade durante o armazenamento em regime de AC.....	31
6.2 Evolução dos parâmetros de qualidade durante 0, 7 e 14 dias de prateleira.....	33
6.3 Evolução de enzimas oxidativa (PPO) e fermentativa (ADH), do teor de fenóis totais e do teor de vitamina C.....	36
6.4. Incidência de desordens relacionadas com o acastanhamento interno.....	40
7.Conclusão.....	43
8.Referências Bibliográficas.....	45
ANEXOS.....	53

Índice de figuras

Figura 1 – Pêra ‘Rocha’	4
Figura 2 – Esquema da biossíntese de etileno	9
Figura 3 – Taxa respiratória de frutos climatéricos e não-climatéricos.....	10
Figura 4 – Localização dos compostos fenólicos, PPO e POD na célula vegetal.....	14
Figura 5 – Esquema da acção da polifenoloxidase (PPO) nos mono e difenóis com formação de quinonas.....	15
Figura 6 – Esquema do ciclo ascorbato-glutationa.....	17
Figura 7 – Reacção de fermentação alcoólica.....	19
Figura 8 – Peras com acastanhamento interno: (a) ‘ <i>brown heart</i> ’ (b) ‘ <i>core browning</i> ’	40

Índice de quadros

Quadro 1 – Indicadores de análise de comércio internacional – Pêra.....	5
Quadro 2 – Principais mercados de exportação de pêra em 2016.....	6
Quadro 3 – Composição química e nutricional da pêra.....	7
Quadro 4 – Taxas de respiração de diferentes produtos hortofrutícolas.....	8
Quadro 5 – Teores de glucose, frutose e sacarose (%) em frutos	24
Quadro 6 – Acidez titulável (%) e pH de alguns frutos.....	26
Quadro 7 – Valores médios de firmeza, teor de sólidos solúveis (TSS) e acidez titulável (AT) avaliados a cada data de saída da câmara, para os dois pomares.....	31
Quadro 8 – Valores de firmeza média (kg/0,5cm ²) analisados, nos seguintes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.	33
Quadro 9 – Valores do Teor de Sólidos Solúveis médios (°Brix) analisados nos seguintes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.	34
Quadro 10 – Valores de Acidez Titulável média (g ácido málico L ⁻¹ sumo) analisados nos seguintes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.	35
Quadro 11 – Valores médios da variação da medição indirecta da actividade da PPO ($\Delta\text{Abs}_{546}/\text{mg}$ proteína) após diferentes tempos de câmara e subsequentes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.....	36
Quadro 12 – Valores médios da variação da medição indirecta da actividade da ADH ($\Delta\text{Abs}_{340}/\text{mg}$ proteína) após diferentes tempos de câmara e subsequentes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.....	37
Quadro 13 – Valores médios do teor de fenóis (mg L ⁻¹ sumo) após diferentes tempos de câmara e subsequentes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.	38
Quadro 14 – Valores médios do teor de vitamina C (mg L ⁻¹ sumo) após diferentes tempos de câmara e subsequentes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.....	39
Quadro 15 – Avaliação da incidência de acastanhamento interno (%) nos lotes de peras analisados (avaliação global dos dois pomares)	41

Lista de Abreviaturas

AA- Ácido Ascórbico

AC- Atmosfera Controlada

ACC - Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

ADH- Álcool Desidrogenase

APX - Ascorbato peroxidase

AT- Acidez Titulável

ATP- Trifosfato de adenosina

BSA -Soro de Albumina Bovina

CAT - Catalase

DCPIP- 2,6- diclorofenolindofenol

DHA - Ácido desidroascórbico

DHAR- Desidroascorbato redutase

DOP- Denominação de Origem Protegida

DPA- Difenilamina

GR- Glutathione redutase

GSSG - Glutathione dissulfato

MDHAR- Monodesidroascorbato redutase

NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH- Fosfato de Dinucleótido de nicotinamida e adenina

PDC- Piruvato Descarboxilase

PPO- Polifenoloxidase

ROS- Espécies Reactivas de Oxigénio

SAM- S-adenosil metionina

SOD- Superóxido dismutase

TSS- Teor de Sólidos Solúveis

1-MCP- 1- Metilciclopropeno

ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1. Introdução/objectivos

Nos dias que correm, cada vez mais existe uma preocupação crescente com a qualidade dos produtos hortofrutícolas em toda a cadeia de valor, desde o produtor, ao grossista e ao retalhista. O consumidor é cada vez mais exigente e apostar na qualidade é o caminho para valorizar o produto. Características como a cor, o tamanho, são aspectos visuais que são valorizados pelo consumidor no momento de compra. Existem depois outras características que são valorizadas no momento de consumo, como o aroma, a acidez, a doçura, a textura. Tem-se verificado uma tendência crescente no consumo de produtos hortofrutícolas. Antigamente, com a conservação pós-colheita pouco desenvolvida, estes produtos tinham uma disponibilidade limitada no mercado, uma vez que são produtos perecíveis, que sofrem alterações fisiológicas durante a sua maturação, com consequente alteração do aroma, cor, firmeza. Hoje em dia, o desenvolvimento das tecnologias de frio, bem como de outros métodos de conservação, aliados ao controlo de alguns parâmetros, tornam estes produtos frescos disponíveis em muitos mercados e com elevada qualidade durante um período longo de tempo.

A pêra ‘Rocha’ é um dos frutos com maior importância económica em Portugal, graças à boa aceitação que tem pelo consumidor, nacional e de outros países.

A pêra, no entanto, é um fruto que é colhido verde e que posteriormente amadurece. Esta continua fisiologicamente activa na fase pós-colheita, ocorrendo diferentes processos que levam à diminuição da firmeza, aumento do teor de sólidos solúveis, diminuição da acidez, aumento dos compostos voláteis do aroma, diminuição dos compostos fenólicos. Estas alterações são essencialmente reguladas pela produção interna de etileno, aliada ao aumento da taxa respiratória. Hoje em dia, a conservação e armazenamento em atmosfera controlada tornam a maturação da pêra regulável, sendo possível retardar durante muito tempo a sua maturação. Estes frutos apresentam por isso elevada capacidade de conservação, permitindo a sua comercialização por um longo período de tempo.

A pêra pode estar sujeita a alguns acidentes fisiológicos que poderão estar associados ao tipo e tempo de conservação. Os principais acidentes fisiológicos que ocorrem em pêra ‘Rocha’ em conservação prolongada são o escaldão superficial, acastanhamento interno e diversas alterações enzimáticas. Até 2013, era utilizado para o controlo destes problemas o antioxidante difenilamina (DPA). No entanto, o uso desta foi proibido efectivamente a partir

de 2013. Uma das soluções actualmente utilizadas em substituição da DPA é o metilciclopropeno, denominado por 1-MCP (Almeida, 2014). No entanto, os grossistas consideram que a sua eficácia é menor, dificultando o seu amadurecimento, e conferindo por vezes um sabor amargo aos frutos.

Pensa-se que o acastanhamento interno poderá ser uma consequência inevitável da conservação prolongada. Os baixos níveis de O_2 que ocorrem nestas condições poderão conduzir a uma situação de hipoxia, provocando *stress* oxidativo e fermentação, que poderão conduzir ao acastanhamento interno.

No projecto inicial que deu origem ao desenvolvimento desta dissertação propõe-se prever a incidência do acastanhamento interno em pêra 'Rocha' através de métodos não destrutivos, recorrendo à técnica da ressonância magnética nuclear; esta abordagem não invasiva para previsão deste acidente fisiológico pode trazer enormes vantagens económicas quando se fala em eficiência da armazenagem por longos períodos de tempo. Assim, este projecto pretende relacionar parâmetros medidos com recurso a esta técnica, com parâmetros físicos, químicos e bioquímicos dos frutos, que permitem caracterizar fisiologicamente o fruto durante a conservação em câmara, e com a incidência de acastanhamento interno, por forma a conseguir antecipar a possível ocorrência deste acidente. Deste modo foram recolhidas amostras (peras) de dois pomares distintos, Mafra e Bombarral, que foram analisadas individualmente sob as três vertentes de modo a poder estabelecer-se alguma relação representativa entre as três vertentes. A análise individual dos frutos, normalmente preterida em favor de amostras compostas por forma a reduzir a variabilidade associada a cada modalidade, foi assim um imperativo do projecto.

Foram feitas análises físico, químicas e bioquímicas para 8 tempos de armazenamento distintos (em câmara de atmosfera controlada dinâmica). Para cada tempo de armazenamento foram avaliadas as mesmas características para tempos de prateleiras diferentes (0, 7 e 14 dias). Para cada momento de observação, antes da realização destas análises, as peras tinham sido sujeitas à medição dos parâmetros de ressonância pertinentes de forma não invasiva. Paralelamente, fez-se uma avaliação da presença de acastanhamento interno. Com este procedimento é possível obter dados do estado de maturação provenientes dos parâmetros químicos, físicos e bioquímicos (avaliação clássica) e relacioná-los quer com as medições de ressonância magnética quer com a presença de acastanhamento, para tentar estabelecer alguma correlação interessante.

Esta dissertação irá incidir na pêra 'Rocha', tendo-se como **primeiro** objectivo estudar a evolução do comportamento da pêra 'Rocha' durante o armazenamento prolongado em atmosfera controlada dinâmica. Para tal procedeu-se ao estudo dos parâmetros de

qualidade mais comuns nesta área: firmeza, teor de sólidos solúveis, acidez titulável, e também a determinações de vitamina C, teor de fenóis totais e de enzimas relacionadas com os metabolismos oxidativo (PPO) e fermentativo (ADH) à saída da câmara de conservação e avaliou-se o seu comportamento em função de 5 diferentes períodos de armazenamento. O **segundo** objectivo deste trabalho foi estudar a evolução destes mesmos parâmetros nas peras, fora da câmara de atmosfera controlada, a uma temperatura de 9°C e 20°C (conservação comercial). Deste modo pretendeu-se estudar quais as principais alterações físico, químicas e bioquímicas durante o período de 7 e 14 dias fora da câmara de AC. O **terceiro** e último objectivo é a determinação de incidência de acastanhamento interno em peras com elevado tempo de conservação em câmara e verificar se existe relação entre as variáveis químicas e bioquímicas antes avaliadas e o aparecimento de acastanhamento.

2. A pêra ‘Rocha’

A pêra ‘Rocha’ (figura 1) é uma variedade portuguesa de pêra, com uma forma predominantemente redonda ovada e redonda piriforme, com calibre médio (60-65 mm), peso médio de 130 g e cor da epiderme amarela ou verde-claro. A polpa, de cor branca, apresenta uma textura granulosa, é sumarenta e doce (ANP, 2009). É um fruto que apresenta uma boa capacidade de conservação e resistência ao manuseamento e transporte (ANP, 2017), apresentando assim um grande potencial para exportação, tal como já acontece.

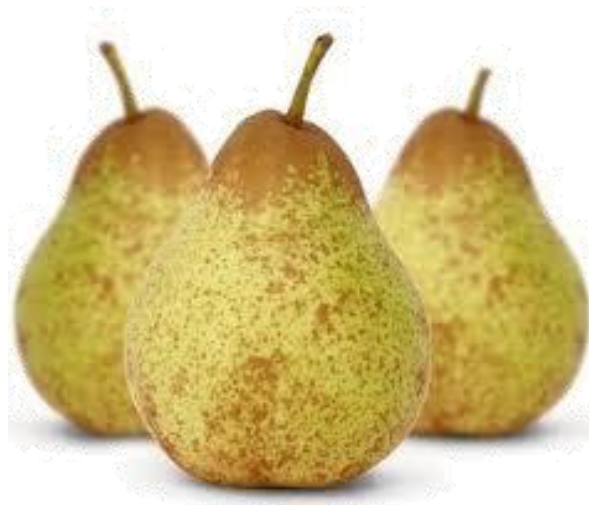


Figura 1 - Pêra ‘Rocha’ (AGROTEC, 2016)

2.1 Produção e comercialização

A produção de pêra tem uma grande importância em Portugal, existindo cerca de 12000 ha de pomares de pêra, valor que pouco variou no triénio de 2014 a 2016. A produção desta fruta entre 2014 e 2016 variou entre 137 805 t (2016) e 210 009 t (2014) (INE, 2017).

Esta cultura tem grande importância na zona Centro do país, representando 89% da produção nacional e 90% área total de pêra, em 2016 (INE, 2017).

O quadro 1 fornece alguns dados indicativos da orientação do produto no mercado.

Quadro 1 – Indicadores de análise de comércio internacional - Pêra (GPP, 2017)

	2014	2015	2016
Orientação Exportadora (%)	66,0	83,8	51,1
Consumo Aparente (t)	83 192	34 413	85 286
Grau de Auto-Aprovisionamento (%)	252,4	410,3	161,6
Grau de Abastecimento do Mercado Interno (%)	85,9	66,6	79,1

(Nota: Orientação Exportadora = Exportação / Produção x 100; Consumo Aparente = Produção + Importação – Exportação; Grau de Auto-Aprovisionamento = Produção / Consumo Aparente x 100; Grau de Abastecimento do mercado interno = (Produção - Exportação) / Consumo Aparente x 100)

Duas informações importantes que este quadro transmite são que o grau de auto-aprovisionamento em pêra foi sempre superior a 100% e que a orientação exportadora foi sempre superior a 50%.

Dos dados acima apresentados, o ano de 2015 revelou ser o ano com maior orientação exportadora (83,8%). Nesse ano, o saldo comercial deste produto foi de 76 milhões de euros (GPP, 2016), concluindo assim que a pêra é um dos produtos frutícolas que contribui positivamente para a balança comercial.

Em Portugal, é a pêra ‘Rocha’ do Oeste DOP que representa um maior peso no mercado. Produzida apenas na região do Oeste, teve a sua origem no concelho de Sintra em 1836, no entanto a sua área de produção estende-se por mais 8 concelhos do oeste: Cadaval, Bombarral, Torres Vedras, Caldas da Rainha, Alcobaça, Lourinhã, Óbidos e Mafra (ANP, 2017).

A colheita da pêra ‘Rocha’ é normalmente feita a partir da segunda semana de Agosto, podendo estender-se até Setembro. A data de colheita é determinada quando certos parâmetros estão com valores determinados, de modo a conferir a melhor qualidade à pêra quando esta chegar ao consumidor. A dureza deve encontrar-se entre os 5,5 e 6,5 kg/0,5 cm², o teor de sólidos solúveis entre os 11 e 13 °Brix, a acidez titulável entre 2 a 3 g/L de ácido málico. Estes parâmetros, assim como os cuidados a ter durante a colheita estão definidos no caderno de especificações da pêra ‘Rocha’ DOP.

Apesar de ser um produto com apenas uma época de colheita, a sua comercialização é feita praticamente durante o ano todo, devido à sua boa capacidade de conservação, sendo também um factor para potenciar a sua exportação para outros países, nomeadamente:

Brasil (36%), Reino Unido (18%) e França (14%), e com menor fluxo para a Alemanha (6%), Irlanda (4%) (quadro 2) (GPP, 2017).

Quadro 2 – Principais mercados de exportação de pêra em 2016 (dados preliminares)
(GPP, 2017)

	Quantidade (toneladas)	Valor (milhares de €)
Brasil	30.316	31.565
Reino Unido	11.871	10.998
França	8.275	8.513
Alemanha	5.379	5.691
Espanha	5.077	5.425
Polónia	3.104	2.847
Irlanda	1.744	1.585
Canadá	1.126	1.258
Itália	762	644
Cabo Verde	665	545
Marrocos	762	429
Angola	281	266
Países Baixos	298	250
Suíça	185	214
Líbia, Jamahira Árabe	237	182
Luxemburgo	107	120
Outros países	175	170
TOTAL	70.364	70.703

2.2 Características nutricionais

De acordo com a análise do INSA (2017) a composição nutricional (da pêra) pode variar com alguns factores como as técnicas agrícolas usadas, data de colheita, conservação e grau de maturação. Em geral a pêra apresenta elevados teores de água (85,1%) e é uma boa fonte de glúcidos (9,4%) e de fibra (2,2%). Quanto à sua composição vitamínica, a que está presente em maior quantidade é a vitamina C (3 mg/100 g de parte edível). Os minerais mais abundantes são o potássio, fósforo, magnésio, cálcio e sódio. No Quadro 3 encontra-se resumida a composição química e nutricional média por 100 g de pêra.

Quadro 3 - Composição química e nutricional da pêra (por 100 g de parte edível)

Designação	Valor
Valor energético	47 kcal
Água	85.1 g
Proteína	0.3 g
Lípidos	0.4 g
Glúcidos	9.4 g
Fibra Alimentar	2.2 g
Vitaminas	
Vitamina A	2 µg
Caroteno	9 µg
α-tocoferol	0.5 mg
Tiamina	0.02 mg
Riboflavina	0.02 mg
Niacina	0.2 mg
Vitamina B6	0.02 mg
Vitamina B12	0 µg
Vitamina C	3 mg
Folatos	2 µg
Minerais	
Cinza	0.36 g
Sódio (Na)	8 mg
Potássio (K)	150 mg
Cálcio (Ca)	9 mg
Fósforo (P)	10 mg
Magnésio (Mg)	9 mg
Ferro (Fe)	0.3 mg
Zinco (Zn)	0.2 mg

(Adaptado de INSA, 2017)

3. Fisiologia pós-colheita da pêra ‘Rocha’: principais aspectos pós-colheita

3.1 Respiração e produção de etileno

Quando os frutos são colhidos continuam a respirar, por forma a disporem de energia para continuarem a sua actividade metabólica. Para isso utilizam substratos (lípidos, açúcares, ácidos orgânicos) que são oxidados na presença de oxigénio, libertando energia (Almeida, 2005).

A taxa respiratória é diferente para os vários hortofrutícolas (Quadro 4). Quanto maior a sua taxa respiratória, pior é a sua capacidade de conservação e o seu período de vida útil é menor (Almeida, 2005). A pêra apresenta uma taxa respiratória de 10 a 20 mg de CO₂ libertado/kg.h, quando conservada a 5°C (Martins & Empis, 2000).

Quadro 4 – Taxas de respiração de diferentes produtos hortofrutícolas (adaptado de Kader, 1992a)

CLASSE	RESPIRAÇÃO A 5 °C (mgCO ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹)	PRODUTOS
Muito baixa	<5	Noz, avelã, castanha, amêndoa, tâmara
Baixa	5-10	Maçã, citrinos, uva, kiwi, cebola, batata
Moderada	10-20	Damasco, banana, cereja, pêsego, nectarina, pêra , ameixa, figo, couve, cenoura, alface, pimento, tomate
Alta	20-40	Morango, framboesa, amora, couve-flor, abacate
Muito alta	40-60	Alcachofra, feijão - verde, Couve-de-bruxelas
Extremamente alta	>60	Espargo, brócolos, cogumelos, ervilha fresca, espinafre, milho-doce

A transpiração é outra das causas da diminuição da qualidade da pêra pós-colheita. Está associada à perda de água por evaporação das células da epiderme. A humidade do ar, a temperatura, a velocidade do ar, a luminosidade e pressão são factores ambientais que influenciam a intensidade de transpiração. Existem factores relacionados com o fruto que também podem influenciar a perda de água, por exemplo danos mecânicos, o estado fisiológico e a razão superfície/volume do produto (Almeida, 2005; Martins & Empis, 2000).

O etileno (C₂H₄) é uma hormona produzida pelas plantas (Veltman, 2002). A sua síntese (figura 2) baseia-se na conversão do aminoácido metionina em S-adenosil metionina (SAM)

que por sua vez é convertida em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela acção da enzima ACC sintase. Como última reacção ocorre a conversão de ACC em etileno (C_2H_4), pela acção da enzima ACC oxidase. A acção destas enzimas (ACC sintase e ACC oxidase) depende de factores genéticos e factores como a temperatura e concentração de oxigénio (Kader, 1992b). Este ciclo de produção de etileno pode ser regulado pelo próprio etileno produzido, induzindo a nova produção das enzimas ACC sintase e ACC oxidase. Este é um factor crítico, uma vez que a produção de etileno induz a sua própria produção, sendo por isso um factor que deve ser controlado aquando do armazenamento dos frutos, por um longo período de tempo.

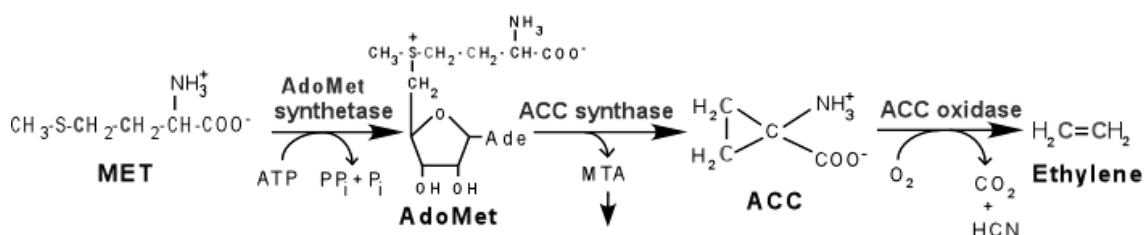


Figura 2- Esquema da biossíntese de etileno (<http://kieber.weebly.com>)

A produção de etileno aumenta com o grau de maturação do fruto (Saltveit, 1999). Elevadas concentrações de etileno induzem a actividade respiratória (Watada *et al.*, 1990). A pêra apresenta uma elevada taxa de produção de etileno, entre 10 a 100 $\mu L C_2H_4/kg/h$, quando se encontra à temperatura ambiente (20°C) (Almeida, 2005; Kader, 1992a). A produção de etileno em frutos por um lado pode ser benéfica, pois pode ser usada como hormona de regulação e controlo dos processos de maturação. Por outro lado quando em excesso pode ser prejudicial, acelerando por vezes o processo de senescência, ou mesmo influenciando outras reacções indesejáveis.

Três dos principais factores que influenciam a actividade respiratória e produção de etileno são a temperatura, a composição da atmosfera e danos mecânicos que originam reacções de *stress* no fruto (Saltveit, 1999).

3.2. A pêra: fruto climatérico

Os hortofrutícolas consumidos em fresco são produtos perecíveis pois ainda continuam fisiologicamente activos (Martins & Empis, 2000). Neste grupo incluem-se os frutos. Durante o período pós - colheita existem frutos que continuam com os processos de maturação mais acelerados, os chamados frutos climatéricos. Nos frutos não-climatéricos o processo de maturação é muito lento. Tanto na respiração climatérica como na respiração não-

climatérica a taxa respiratória vai diminuindo ao longo do tempo pós-colheita, porém na respiração climatérica, ocorre um pico em que a taxa respiratória atinge o seu valor máximo, tal como se observa na figura 3. Assim, um fruto climatérico é caracterizado por apresentar no final da sua maturação um aumento da taxa respiratória provocada pelo aumento da produção de etileno. Os frutos não-climatéricos são caracterizados por apresentarem uma diminuição mais lenta da taxa respiratória, devido também à baixa produção de etileno destes, após colheita, portanto não devem ser colhidos antes da sua maturação.

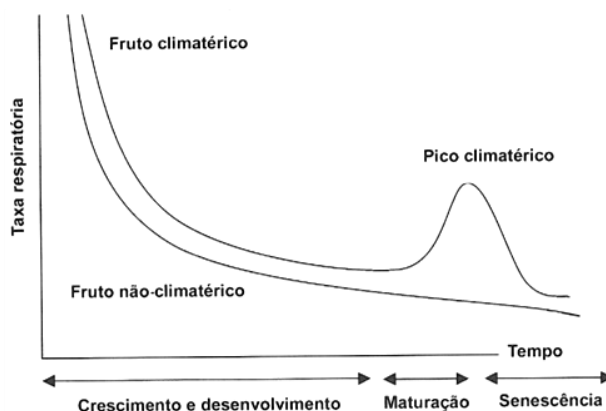


Figura 3 – Taxa respiratória de frutos climatéricos e frutos não - climatéricos (Wills *et al.*, 1989)

A pêra é um fruto climatérico e, como tal, após a colheita, continua o seu processo de amadurecimento, estando por isso sujeita a alterações químicas, físicas e bioquímicas, a nível dos açúcares e acidez, da firmeza e da actividade enzimática, respectivamente. É na fase posterior à colheita, a fase climatérica (figura 3), que se verifica um aumento da actividade respiratória (Coutinho *et al.*, 2003), e é quando se desenvolvem e acentuam as qualidades sensoriais, sabor e aroma, característicos da pêra (pico climatérico) (Saquet & Almeida, 2016; Veltman, 2002). Após o pico climatérico (onde a taxa respiratória é máxima) dá-se a fase de senescência em que o fruto começa a perder qualidade. As peras para conservação devem ser colhidas num estado de maturação inferior ao desejável no consumo, quando ainda se encontram bastante firmes, de modo a permitir uma melhor conservação e que haja um posterior desenvolvimento das características organolépticas no momento em que chega ao consumidor.

Assim a fisiologia pós-colheita da pêra é caracterizada pelo aumento da taxa respiratória e produção de etileno; aumento do teor de açúcares de baixo peso molecular (teor de sólidos solúveis) e diminuição do teor de ácidos; aumento dos compostos voláteis do aroma, diminuição dos compostos fenólicos; desenvolvimento da cor e diminuição da firmeza da polpa devido às reacções de hidrólise enzimática (Alpalhão *et al.*, 2009; Lombardi *et al.*, 2000; Lurie, 1998; Martins & Empis, 2000).

4. Armazenamento pós-colheita em condições de atmosfera controlada

4.1 Objectivos a atingir no armazenamento e abordagens mais frequentes

Na indústria dos hortofrutícolas, um dos objectivos é que os produtos apresentem frescura e qualidade para o consumidor. Uma das preocupações urgentes no pós-colheita dos hortofrutícolas, que serão comercializados em fresco, é sem dúvida a conservação dos mesmos, garantindo a sua qualidade até ao momento de consumo.

Existem três factores principais que são controlados no pós-colheita dos frutos, de modo a garantir a sua qualidade: a temperatura, a humidade relativa do ar e a composição da atmosfera no armazenamento (Martins & Empis, 2000; Pinto & Morais, 2000).

Hoje em dia, a tecnologia de frio é um método de armazenamento bastante desenvolvido que tem por objectivo aumentar a longevidade dos produtos frescos, para que estes mantenham o máximo da sua qualidade sensorial e nutricional.

A temperatura de refrigeração deve ser adequada e reduzir a velocidade de amadurecimento dos frutos em câmara, a produção de etileno, a taxa de respiração e consequentes alterações, e reduzir a actividade microbiana. Alguns produtos hortofrutícolas mais perecíveis quando estão expostos durante um longo período de tempo a baixas temperaturas, ou quando as temperaturas são muito mais baixas do que a temperatura óptima, podem sofrer danos pelo frio. Cada produto apresenta uma temperatura óptima de conservação (Almeida, 2005; Pinto & Morais, 2000), sendo que a pêra tem uma temperatura de armazenamento que varia entre -0,5 e 1°C (ANP, 2009).

O controlo da humidade relativa do ar é outro factor determinante no armazenamento prolongado, uma vez que reduz a perda de água nos tecidos dos frutos para a atmosfera, quando em conjunto com a temperatura baixa. Na conservação da pêra utiliza-se uma humidade relativa entre 90 a 95% (Pinto & Morais, 2000).

A atmosfera controlada é uma tecnologia muito utilizada hoje em dia, em que é alterada e regulada a composição da atmosfera normal (78% N₂, 21% O₂, e 0,03% CO₂) dentro da câmara, consoante a actividade metabólica do produto. Esta alteração da composição da atmosfera, para uma atmosfera pobre em oxigénio, tem por objectivos minimizar a

respiração e produção de etileno, o amadurecimento rápido dos frutos, a senescência dos mesmos e também reduzir o desenvolvimento e invasão de agentes patogénicos (Pedreschi *et al.*, 2008), reforçando o efeito da baixa temperatura. Normalmente são alteradas as concentrações de oxigénio (O_2) para concentrações inferiores às da atmosfera normal e o dióxido de carbono (CO_2) para concentrações superiores às da atmosfera normal (Almeida, 2005; Franck *et al.*, 2007; Martins & Empis, 2000). Apesar de as baixas concentrações de oxigénio praticadas trazerem vantagens, devem ter-se em atenção as concentrações de oxigénio demasiado baixas, uma vez que podem levar a condições de anaerobiose (Almeida, 2005). A concentração de O_2 normalmente utilizada varia entre 1 a 3% a de O_2 e a de CO_2 entre 0 a 5%, sendo ajustada em função de diferentes factores, como por exemplo a cultivar (Villalobos-Acuña & Mitcham, 2008). No caso da pêra, que é um fruto climatérico, a concentração mínima tolerável de O_2 é 1% e a concentração máxima de CO_2 é 2% (Martins & Empis, 2000). A uma atmosfera em que a composição é regulada constantemente por sensores de acordo com o nível de *stress* em que o fruto se encontra, denominamos de atmosfera controlada dinâmica.

A pêra 'Rocha' quando conservada em atmosfera controlada, apresenta uma elevada durabilidade, cerca de 9 a 10 meses (ANP, 2009), sendo que um dos factores primários determinante para garantir a qualidade é o ponto de colheita certo (Kader *et al.*, 1989).

Uma das principais limitações da tecnologia de atmosfera controlada relativamente à conservação de pêra 'Rocha' prende-se com as temperaturas baixas associadas a tempos de conservação prolongados. Se as condições de atmosfera controlada não estiverem equilibradas, podem dar origem a problemas como o escaldão superficial. O acastanhamento interno é outro problema que pensa-se estar associado também à conservação prolongada aliada à composição pobre em oxigénio e rica em dióxido de carbono (Deuchande *et al.*, 2016), que tem sido preocupante para os armazenistas nestes últimos anos. Deve por isso ter-se em atenção o equilíbrio entre a temperatura e a concentração de oxigénio e dióxido de carbono aplicada (Pedreschi *et al.*, 2008), para não resultarem danos como o escaldão superficial e acastanhamento interno (Kupferman, 2001) e os frutos não entrarem em respiração anaeróbia e degradação.

4.2 Acastanhamento interno

4.2.1 Desenvolvimento e sintomas

Tal como foi referido anteriormente, o acastanhamento interno representa uma grande preocupação para os armazenistas, pois os seus sintomas não são visíveis externamente

como é o caso do escaldão, tornando difícil a sua identificação e controle. Este problema poderá conduzir a grandes perdas económicas neste sector (Franck *et al.*, 2007). Existem dois tipos principais de acastanhamento interno, o '*core browning*' e '*brown heart*'. O '*core browning*' caracteriza-se pela decomposição da polpa. O '*brown heart*' caracteriza-se pelo aparecimento de cavidades secas derivadas de lesões nos tecidos da região centro do fruto. Este aparece inicialmente na zona central interior do fruto, expandindo depois concentricamente para o tecido do córtex do fruto. Em casos mais severos, pode levar à perda de água e consequente aparecimento das referidas cavidades (Adams, 2010; Larrigaudière *et al.*, 2004).

4.2.2 Causas possíveis

Existem factores relacionados com o fruto que podem influenciar directa ou indirectamente o aparecimento de acastanhamento interno, como o estado de maturação mais ou menos avançado do fruto, a sua variedade, as condições locais de produção e a sua componente genética.

Além dos factores associados ao fruto, outras hipóteses foram apresentadas como causadoras deste problema. Uma delas seria o efeito da conservação prolongada em atmosfera controlada. Níveis não adequados de O₂ e CO₂ podem afectar a actividade fisiológica da pêra (Franck *et al.*, 2007), gerando-se situações específicas de *stress* no fruto, que podem estar na origem do escurecimento enzimático ou metabolismo fermentativo do mesmo.

4.2.2.1 Escurecimento enzimático

O acastanhamento interno pode ter origem enzimática (escurecimento enzimático). Segundo Franck *et al.* (2007), uma das causas do escurecimento enzimático é a oxidação de compostos fenólicos pela enzima polifenoloxidase (PPO) na presença de oxigénio. Os compostos fenólicos são substratos sintetizados no retículo endoplasmático, de onde são expelidos e transportados por vesículas para a parede celular e vacúolo, onde se encontram em maior quantidade (97% no vacúolo) (figura 4).

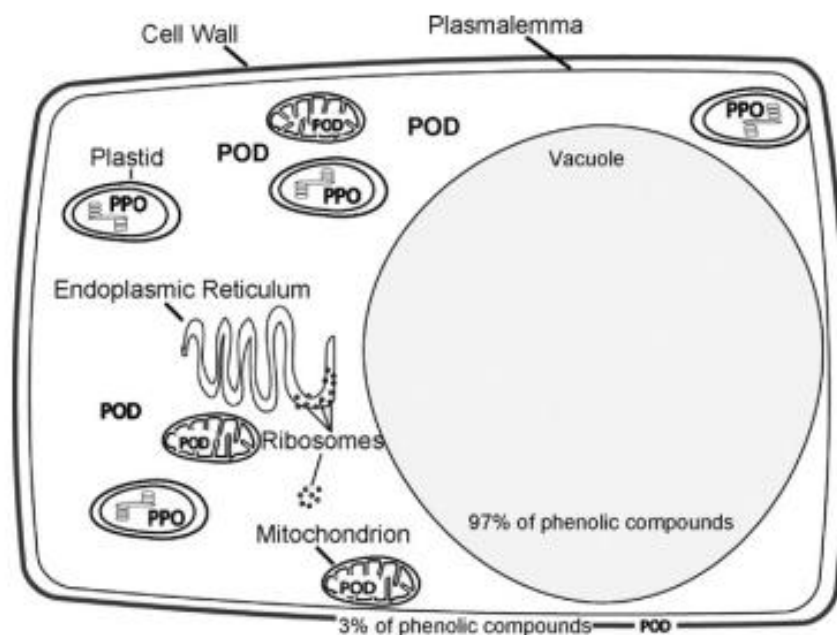


Figura 4 - Localização dos compostos fenólicos, PPO e POD na célula vegetal (Toivonen & Brummell, 2008)

Os compostos fenólicos e a enzima PPO encontram-se separados em diferentes compartimentos da célula (figura 4), no entanto, com a conservação prolongada, situações de *stress* podem ocorrer, causando a ruptura das membranas, permitindo assim a libertação da enzima PPO e compostos fenólicos. Ao estarem em contacto entre eles, e na presença de oxigénio, a PPO oxida os fenóis a orto-quinonas, que numa outra reacção formam melaninas, de cor castanha (Cheng & Crisosto, 1995; Franck *et al*, 2007; Mathew & Parpia, 1971; Yoruk & Marshall, 2003). No caso da pêra, o principal substrato fenólico das reacções de escurecimento enzimático é o ácido clorogénico. Assim, o escurecimento enzimático é uma consequência directa da destruição ou perda de integridade das membranas celulares.

A primeira reacção que ocorre trata-se da hidroxilação dos monofenóis a orto-difenóis (figura 5) e a segunda trata-se da oxidação dos orto-difenóis em orto-quinonas. As orto-quinonas sofrem uma reacção de polimerização, formando polímeros escuros, as melaninas. Além disto, as orto-quinonas podem ter um efeito negativo reagindo com proteínas, aminoácidos e outros nutrientes (Toivonen & Brummell, 2008).

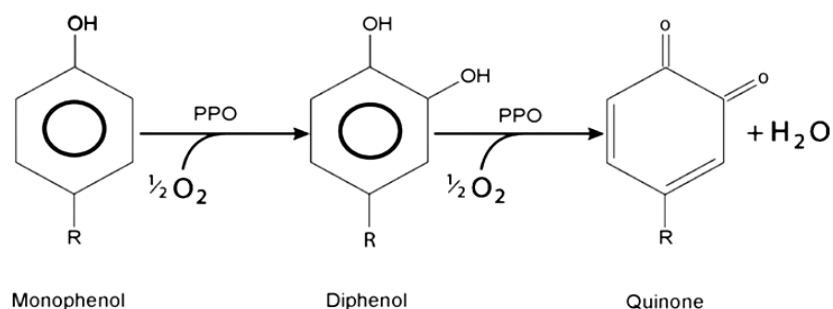


Figura 5 - Esquema da acção da polifenoloxidase (PPO) nos mono e difenóis com formação de quinonas (Toivonen & Brummell, 2008)

Os compostos formados na reacção enzimática, apesar de terem efeitos indesejáveis, também têm efeitos benéficos servindo de barreira a infecções causadas por agentes patogénicos, evitando a sua expansão.

A actividade desta enzima pode ser mais ou menos controlada. A PPO tem uma actividade óptima a um pH entre 4,0-8,0, sendo inactivada a pH abaixo de 4,0 (Gomes *et al.*, 2014; Yoruk & Marshall, 2003), no entanto este é um factor difícil de controlar durante o armazenamento. Os antioxidantes como o ácido ascórbico e os ácidos fenólicos presentes na pêra contribuem para a maior acidez desta (menor pH), e deste modo contribuem para reduzir a actividade enzimática da PPO e o consequente escurecimento. Outra forma de minimizar a actividade enzimática da PPO seria pela aplicação de temperaturas altas, aplicadas através por exemplo do branqueamento (Nogueira, 1973), para frutos que serão posteriormente processados.

Muitas vezes o aumento da actividade desta enzima aparece associado à diminuição dos componentes responsáveis por evitar as oxidações, como é o caso do ácido ascórbico. Num estudo com 8 variedades de peras iranianas ('Shah miveh', 'Siv harmah', 'Sorah', 'Bakhi', 'Sibri shahini', 'Beleshti', 'Hamro bah' e 'Sibri sarchi') conservadas durante 90 dias em câmara refrigerada a 1°C, Saba & Moradi (2016) verificaram um aumento da actividade da PPO que se correlaciona positivamente com o aumento da incidência de acastanhamento interno. Em contrapartida, a concentração de ácido ascórbico diminuiu, assim como o teor de fenóis totais, diminuindo a capacidade antioxidante. A PPO é considerada a principal enzima associada ao acastanhamento em hortofrutícolas, sendo que a sua quantidade varia com a cultivar.

4.2.2.2 Stress oxidativo

Durante o ciclo de vida dos hortofrutícolas, estes estão sujeitos a desequilíbrios causados por diversos factores, que causam alterações significativas das condições normais do fruto, o *stress*. Estas situações de *stress* induzem muitas vezes respostas no metabolismo fisiológico dos hortofrutícolas.

No metabolismo normal das células vegetais existe alguma produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), nas reacções de auto-oxidação. Estas são formas reduzidas do oxigénio: o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (OH^{\bullet}) e o singleto de oxigénio ($^1\text{O}_2$) (Davey *et al.*, 2000). Estas ROS são formadas por transferência de electrões, sendo que a mais reactiva é o radical hidroxilo, formado pela reacção do peróxido de hidrogénio com o ião ferro (Fe^{3+}) (Latowski *et al.*, 2010).

O armazenamento em atmosfera controlada a baixas temperaturas associados aos altos níveis de CO_2 fazem acumular as ROS, causando o seu excesso e um défice no sistema antioxidante. Quando ocorre este desequilíbrio, estamos perante um *stress* oxidativo. Na primeira reacção de auto-oxidação é produzido o radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$, que é depois reduzido a peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e ao anião hidroxilo reactivo (OH^{\bullet}), que em soluções aquosas é extremamente reactivo, causando peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e até morte celular (Franck *et al.*, 2007). Os níveis de ROS são mantidos ou mesmo removidos pelo sistema antioxidante. No entanto, em condições de *stress*, a produção de ROS aumenta e acumula, acabando o sistema antioxidante por não ser suficiente, devido à intensa actividade oxidativa, contribuindo para anomalias e danos irreversíveis no metabolismo das células.

Uma das consequências do *stress* oxidativo referidas é a peroxidação lipídica nas membranas, que é uma reacção iniciada devido ao excesso de ROS. Incide numa cadeia de reacções de oxidação em ácidos gordos polinsaturados de fosfolípidos da membrana, formando-se peróxidos lipídicos, que são reactivos com metais, formando substâncias tóxicas para as células e aldeídos (Sousa *et al.*, 2007). A peroxidação lipídica pode estar directamente associada à desintegração da membrana.

4.2.2.3 Sistema antioxidante

Os hortofrutícolas possuem antioxidantes responsáveis pela defesa perante o *stress* oxidativo causado pelas ROS. Os antioxidantes são substâncias que, em pequenas concentrações, retardam ou mesmo neutralizam a acção das ROS, convertendo-as em

moléculas inofensivas para as células (Sousa *et al.*, 2007). O sistema antioxidante da pêra é composto essencialmente por ácido ascórbico, por compostos fenólicos, e várias enzimas do ciclo ascorbato-glutationa.

O ciclo ascorbato-glutationa (figura 6) consiste numa série de reacções enzimáticas e tem como principal finalidade a remoção de ROS. Nelas participam as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX), a monodesidroascorbato redutase (MDHAR), a desidroascorbato redutase (DHAR) e a glutatona redutase (GR). Estas enzimas encontram-se presentes em vários compartimentos celulares. A SOD é responsável pela conversão de superóxido em H_2O_2 , sendo que o H_2O_2 pode ser catalisado pela CAT em O_2 e H_2O ou pode ser degradado pela enzima APX através da oxidação de ascorbato em monodesidroascorbato (MDHA). O MDHA pode ser convertido em ascorbato pela enzima MDHAR ou pode ser convertido em desidroascorbato (DHA). O DHA é convertido novamente em ascorbato pela acção da DHAR através da oxidação de glutatona em glutatona dissulfato (GSSG). A reacção inversa é catalisada pela enzima GR, com oxidação de NADPH em NAD^+ (Latowski *et al.*, 2010)

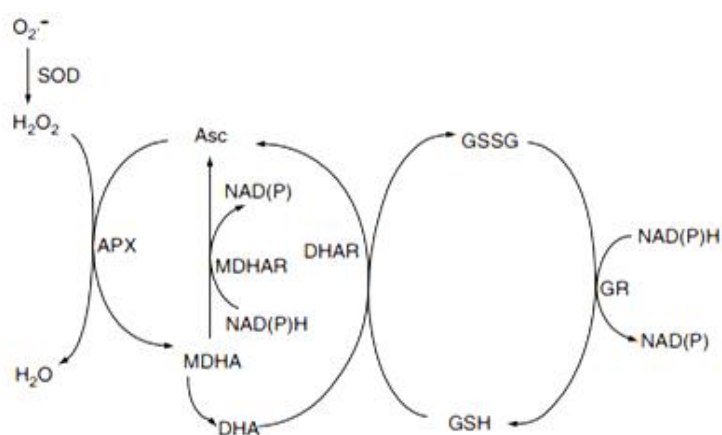


Figura 6 - Esquema do ciclo ascorbato-glutationa (Latowski *et al.*, 2010)

Os outros dois antioxidantes naturais de grande importância presentes no sistema antioxidante da pêra são o ácido ascórbico e os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos têm um papel fundamental na fisiologia pós-colheita, protegendo os frutos em condições de *stress* oxidativo (Brecht *et al.*, 2007; Degáspari & Waszczynskyj, 2004; Escarpa & González, 2001; Robards *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2006; Soares, 2002). O efeito antioxidante dos compostos fenólicos baseia-se na capacidade de bloquear o início da oxidação, ou seja remover as espécies reactivas de oxigénio (reacção enzimática), ou reagir com os radicais, eliminando-os (reacção não enzimática) (Angelo & Jorge, 2007). Além de

efeito antioxidante, os compostos fenólicos podem ainda actuar como agentes anti-patogénicos (Angelo & Jorge, 2007; Yoruk & Marshall, 2003).

Segundo o estudo de Salta *et al.* (2010), a pêra 'Rocha' apresenta uma capacidade antioxidante e um teor de fenóis totais mais elevados quando comparada com outras variedades de pêra. Existem vários tipos de compostos fenólicos e, a sua capacidade antioxidante deve-se à sua estrutura química e também ao seu poder redutor, sendo indispensáveis na inibição da peroxidação lipídica (Sousa *et al.*, 2007).

O ácido ascórbico é um antioxidante natural da pêra, também com função redutora responsável pela destruição do peróxido de hidrogénio e outras ROS através do ciclo descrito anteriormente. Está envolvido na reacção de reversão da oxidação dos fenóis, reduzindo as orto-quinonas a orto-fenóis, impedindo deste modo a formação de compostos acastanhados, e consequente escurecimento (Brecht *et al.*, 2007; Larrigaudière *et al.*, 2004). É um antioxidante muito instável pois é sensível a factores como o oxigénio e temperaturas altas (Wonsawat, 2014). Na presença de oxigénio, o ácido ascórbico oxida a ácido desidroascórbico, que possui um pH abaixo de 4, reduzindo assim a velocidade das reacções enzimáticas de escurecimento, nomeadamente as reacções causadas pela PPO. Presume-se que as concentrações dos gases (O_2 e CO_2) da atmosfera controlada, e a concentração destes no interior da pêra influenciam o processo de respiração e, como tal, influenciam os níveis de energia assim como a concentração de ácido ascórbico e dos antioxidantes. De referir que o processo de respiração é importante no metabolismo do ácido ascórbico, uma vez que o NADPH produzido é utilizado no processo de regeneração do ácido desidroascórbico (forma oxidada do ácido ascórbico) (Franck *et al.*, 2007).

Um dos factores que pode afectar a concentração de ácido ascórbico e fenóis na pêra é a data de colheita, pois quanto mais tardia for, mais baixas são as concentrações de antioxidantes, tornando o fruto mais susceptível aos acidentes fisiológicos (Davey *et al.*, 2000).

4.2.2.4 Metabolismo fermentativo

No fruto, o metabolismo fermentativo é activado quando o fruto deixa de realizar a respiração aeróbia e passa a fazer a respiração anaeróbia, como principal forma de fornecer energia à realização das suas necessidades metabólicas.

Uma das causas principais desta ocorrência é o armazenamento prolongado em atmosfera controlada, sob baixos níveis de O_2 e altos níveis de CO_2 . Estas condições permitem a

diminuição da actividade metabólica nos frutos, mantendo assim os atributos de qualidade por longos períodos de tempo. No entanto, os níveis demasiado baixos de O_2 podem originar situações de hipoxia no interior dos frutos causando *stress* oxidativo e consequente fermentação (Brecht *et al.*, 2004; Deuchande *et al.*, 2016; Franck *et al.*, 2007). Os frutos têm um nível crítico mínimo de O_2 , abaixo do qual o fruto passa a fazer respiração anaeróbia, como tal, quando este é atingido deve ser constantemente regulado (Adams, 2010; Deuchande *et al.*, 2016). A energia produzida no metabolismo fermentativo (em ATP) é muito inferior à produzida na respiração aeróbia; por sua vez, ao haver menos energia disponível, menor será a eficiência da regeneração celular e, consequentemente, menor a manutenção do sistema antioxidante (Deuchande, *et al.*, 2014). Havendo um défice do sistema antioxidante, pode ocorrer a acumulação de espécies reactivas de oxigénio, provocando assim um desequilíbrio dos processos oxidativos e redutores no fruto. Presume-se que a incidência de desordens associadas ao acastanhamento interno da pêra estejam relacionadas com a perda de eficiência destes processos de defesa (Franck *et al.*, 2007).

No processo de fermentação (alcoólica) são activadas as enzimas fermentativas, sendo dividido em duas reacções principais. Na primeira ocorre a descarboxilização do piruvato (figura 7) em acetaldeído pela acção da enzima piruvato descarboxilase (PDC). Na segunda reacção ocorre a conversão reversível de acetaldeído em etanol, pela acção da enzima álcool desidrogenase (ADH) e utilizando o NADH (Ke *et al.*, 1993). A reacção que origina o piruvato é a reacção de glicólise.

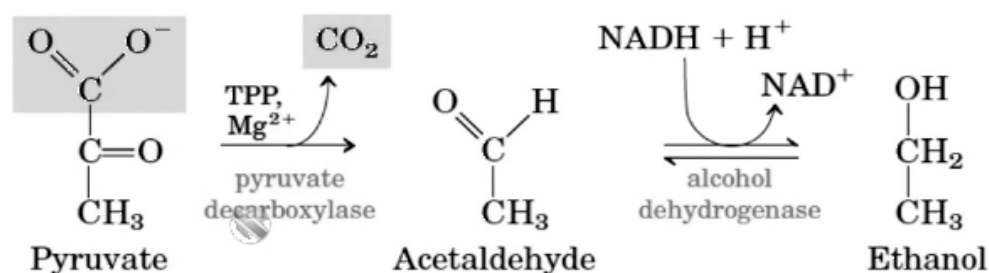


Figura 7 -Reacção de fermentação alcoólica (<https://biochem4life.wordpress.com>)

Quando ocorre a fermentação, há produção de metabolitos fermentativos como o acetaldeído e o etanol que podem ser tóxicos para as células e até mesmo provocar a perda da integridade da membrana (Deuchande *et al.*, 2016; Kader *et al.*, 1989). Isto foi verificado por Franck *et al.* (2007), num estudo com peras 'Bartlett' mantidas em concentrações muito baixas de O_2 e altas de CO_2 . Além disto, verificou-se uma descida do teor de ácido ascórbico, devido às condições de anoxia no interior do fruto provocada pela má difusão do O_2 nas células e hipoxia no exterior junto à casca. A má difusão do O_2 no fruto pode ser

causada por factores como a densidade, a porosidade e também o tamanho do fruto, pois quanto maior este for, maior a distância de difusão do oxigénio. Deste modo, o metabolismo fermentativo em peras pode estar na origem das desordens de acastanhamento interno.

Segundo Deuchande *et al.* (2014), existe uma relação positiva entre a incidência de acastanhamento interno e os elevados níveis de metabolitos fermentativos como o etanol e acetaldeído em pêra 'Rocha'. Associado também ao aparecimento de acastanhamento interno está a diminuição da concentração de ácido ascórbico.

Presume-se assim que o acondicionamento em atmosfera controlada pode, em certas condições, promover a fermentação de peras, sendo activadas nestas condições enzimas fermentativas como a álcool desidrogenase (ADH). Uma forma de avaliar a incidência de fermentação em frutos é medir a quantidade de ADH inicial e após sair da câmara, verificando se esta aumentou ou não. Segundo um estudo com peras 'Blanquilla', Pintó *et al.* (2001) verificaram que a actividade da álcool desidrogenase (ADH) aumentou consideravelmente nos frutos armazenados por longos períodos de tempo (6 meses) a 2% de O₂ e 5% de CO₂, sendo maior em frutos com acastanhamento interno. Atmosferas ricas em CO₂ (5%) favorecem as reacções fermentativas associadas ao acastanhamento, isto comprovou-se num estudo de Galvis-Shánchez *et al.* (2006), após 4 meses em atmosfera controlada a uma temperatura aproximada de 2°C, as peras apresentaram maior incidência de acastanhamento e menor quantidade de ácido ascórbico numa atmosfera com 2 kPa de O₂ e 5 kPa de CO₂, em comparação com atmosferas com concentrações mais baixas de CO₂.

Uma das questões que se tem colocado é o efeito da aplicação da atmosfera controlada retardada na redução do aparecimento de acastanhamento interno. Este método denomina-se de atmosfera controlada diferida, em que os frutos permanecem um período inicial em frio normal, sem aplicação de uma atmosfera controlada. Alguns autores consideram que a aplicação de uma atmosfera controlada retardada poderia ter efeitos positivos nos níveis de energia (ATP) ao longo do armazenamento, sem trazerem desvantagens para a qualidade do fruto. O aumento dos níveis de ATP tinha como objectivo os frutos terem mais energia durante o armazenamento, tornando-os mais resistentes aos distúrbios do acastanhamento e, desta forma, mais adaptáveis ao *stress* oxidativo e a diferentes concentrações gasosas do armazenamento prolongado em atmosfera controlada. Desta forma, os frutos teriam também mais energia para fazer frente às necessidades metabólicas durante o armazenamento, como a manutenção do sistema antioxidante e reparações celulares.

Segundo o estudo de Saquet *et al.* (2003) com peras 'Conference' sujeitas a uma atmosfera controlada diferida por um período de 21 dias a 0°C, verificou-se uma redução da incidência

de acastanhamento interno. Estas não apresentaram grandes alterações da firmeza, cor, teor de sólidos solúveis e acidez. Em contrapartida apresentaram maiores níveis de energia (ATP), maior produção de etileno e maior taxa respiratória nos primeiros 2 meses de armazenamento. Num posterior estudo com pêra 'Rocha', Saquet *et al.* (2017) avaliaram o efeito da aplicação imediata e tardia (após 46 dias), de AC, e ainda avaliaram o efeito da aplicação de diferentes pressões de O₂ (3 kPa e 0,5 kPa). As peras foram armazenadas por um longo período de tempo (257 dias) a uma temperatura de -0,5°C, sendo a pressão de CO₂ de 0,6 kPa. Verificou-se com este estudo que a aplicação imediata de AC com pressões de 0,5 kPa de O₂ foi a mais bem sucedida quanto à incidência de desordens fisiológicas.

No entanto, no estudo de Silva *et al.* (2009), em pêra 'Rocha', não se verificaram diferenças significativas relativamente ao aparecimento de acastanhamento interno em atmosfera controlada diferida e atmosfera controlada, por um longo período de tempo (6 meses).

4.3 Evolução dos parâmetros que contribuem para a qualidade

A conservação em atmosfera controlada, se for mantida de forma adequada, visa mitigar os problemas descritos anteriormente e outros, também contribuindo para manter ao máximo as características sensoriais e qualitativas da pêra por um longo período de tempo, de modo que esta, quando for consumida, satisfaça o consumidor.

Como foi descrito no capítulo anterior, ocorrem alterações fisiológicas naturais durante o processo de maturação normal da pêra. O objectivo da câmara em atmosfera controlada, é que durante o período de armazenamento por um longo período de tempo, essas alterações, associadas ao teor de sólidos solúveis, acidez, vitamina C, teor de fenóis e firmeza sejam minimizadas.

Deste modo, são caracterizados de seguida alguns dos parâmetros que contribuem para a qualidade da pêra 'Rocha'. São também apresentados alguns estudos com pêra, em diferentes condições de atmosfera controlada por longos períodos de tempo, onde se pretendeu verificar qual o comportamento da pêra em câmara. Além disso são ainda apresentados estudos onde se pretende analisar qual a evolução destes parâmetros em tempo de prateleira de 14 dias. A observação das alterações na composição química, física e bioquímica da pêra podem ajudar a despistar ou solucionar possíveis causas associadas aos problemas da conservação desta fruta.

4.3.1 Firmeza

A firmeza é uma característica da polpa do fruto, que se pode definir como a sua capacidade de resistir a uma força exercida sobre si. A firmeza dos frutos diminui com a maturação do mesmo.

Com o amadurecimento, a permeabilidade das membranas aumenta, devido à estrutura da parede celular estar mais fraca, sendo as membranas mais facilmente rompidas, perdendo turgescência (Brecht *et al.*, 2007; Watada *et al.*, 1990). Assim, a redução da firmeza das peras pode ser uma consequência da grande perda de água dos tecidos do fruto (Lombardi *et al.*, 2000).

A perda de firmeza dos frutos pode também estar associada a alterações ao nível da composição e organização de compostos da parede celular: pectina, hemiceluloses e polissacáridos de celulose (Goulao *et al.*, 2006). Na origem destas alterações podem estar as reacções enzimáticas (Ahmed & Labavitch, 1980; Goulao *et al.*, 2010; Sigrist, 2002), causando a degradação dos compostos da parede, a desnaturação de proteínas e peroxidação lipídica (Brecht *et al.*, 2004).

A firmeza é uma característica que define a qualidade do fruto ao longo da cadeia de abastecimento (Goulao *et al.*, 2010). Assim, o tempo de vida útil dos frutos frescos em prateleira depende também do estado da firmeza, sendo que um fruto pouco firme apresenta um tempo de vida útil muito mais limitado, uma vez que está mais susceptível a danos físicos e ao ataque de agentes patogénicos (Cantu *et al.*, 2008; Goulao & Oliveira, 2008). Com o estudo de Galvis-Shánchez & Morais (2001), verificou-se que, durante o processo normal de amadurecimento, a pêra sofreu uma diminuição significativa da firmeza, quando exposta até 9 dias em atmosfera normal à temperatura ambiente (19-20°C). O mesmo se verificou no estudo de Oliveira *et al.* (2014), uma diminuição significativa da firmeza das peras, após um período de prateleira de 2, 4, 6 e 8 dias a 20°C.

Num estudo de Martin *et al.* (2015) sobre pêra 'Rocha', onde se pretendia avaliar o efeito de diferentes condições de atmosfera controlada (AC), verificou-se que o armazenamento de peras por oito meses e meio, em condições de AC, com 1,0 kPa de O₂ + 1,0 kPa de CO₂ e 1,0 kPa de O₂ + 2,0 kPa de CO₂ é adequado mantendo-se as características de qualidade e um amadurecimento normal dos frutos após a saída da câmara. Silva *et al.* (2009), verificaram em pêra 'Rocha' que, de um modo geral, durante 6 meses em armazenamento em AC (2,5% O₂ e 0,7% CO₂), não houve alterações significativas na firmeza.

A firmeza é um factor importante no momento da aquisição do fruto pelo consumidor, pois é uma das primeiras características que este pode avaliar, e que muitas vezes associa ao seu grau de maturação (Goulao *et al.*, 2010; Kader, 1999).

4.3.2 Vitamina C

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel, presente nos hortofrutícolas frescos. No caso da pêra, esta apresenta um baixo teor de vitamina C ($4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) em comparação por exemplo com os citrinos que constituem uma boa fonte desta vitamina ($30 \text{ a } 50 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) (Davey *et al.*, 2000; Pisoschi *et al.*, 2008).

Nos tecidos vegetais, a vitamina C tem também função antioxidante inibindo as reacções oxidativas (Galvis-Shánchez *et al.*, 2006; Pisoschi *et al.*, 2008; Veltman, 2000; Wonsawat, 2014).

A quantidade de vitamina C em frutos pode ser afectada por factores como a perda de água, temperaturas altas, presença de oxigénio, enzimas oxidativas (Brecht *et al.*, 2007; Muhammad *et al.*, 2014; Pisoschi *et al.*, 2008; Wonsawat, 2014) e produção de etileno (Saltveit, 1999). Segundo Davey *et al.* (2000), não existe um comportamento definido sobre o efeito da maturação na evolução da quantidade de ácido ascórbico. No entanto num estudo, Muhammad *et al.* (2014) verificaram que frutos como a laranja, maçã, abacaxi, goiaba, com excepção do caju e melancia, apresentaram maiores teores de ácido ascórbico antes da maturação, concluindo que em geral o teor de ácido ascórbico era superior em frutos imaturos, e que a maturação poderá influenciar neste sentido.

Silva *et al.* (2009), quanto à evolução da concentração de vitamina C (ácido ascórbico) em pêra 'Rocha' armazenada durante 6 meses em AC ($2,5\% \text{ O}_2$ e $0,7\% \text{ CO}_2$) verificaram uma diminuição nos primeiros meses de armazenamento. Lee & Kader (2000) e Veltman *et al.* (2002) também verificaram uma descida da concentração de ácido ascórbico ao longo da conservação em atmosfera controlada.

O ácido ascórbico (AA) pode ser oxidado a ácido desidroascórbico (DHA), sendo que este processo pode ser acelerado na presença de iões metálicos, temperaturas altas, luz, condições alcalinas (acima de pH 6) e na presença de enzimas peroxidase e ácido ascórbico oxidase (Ribeiro & Seravelli, 2007). Deste modo, o teor de vitamina C em alimentos pode indicar se as condições de armazenamento permitiram manter a qualidade nutricional do alimento (Danieli *et al.*, 2009, Pisoschi *et al.*, 2008, Silva *et al.*, 2007). A concentração de ácido ascórbico é mais estável em frutos do que em vegetais, devido à maior acidez destes (Davey *et al.*, 2000; Ribeiro e Seravalli, 2007).

A vitamina C é importante para o nosso organismo, uma vez que tem um papel biológico importante na biossíntese do colagénio e cicatrização de feridas. Actua também como antioxidante contra doenças provocadas por radicais livres (Davey *et al.*, 2000; Lee & Kader, 2000; Muhammad *et al.*, 2014; Pisoschi *et al.*, 2008). No entanto quantidades excessivas de vitamina C também podem ser prejudiciais à saúde, causando nomeadamente problemas gástricos e renais (Pisoschi *et al.*, 2008).

4.3.3 Teor de Sólidos Solúveis

Os sólidos solúveis de um fruto, na sua maioria açúcares, têm uma grande importância na sua qualidade organoléptica, uma vez que são responsáveis por lhe conferir doçura. De um modo geral, um elevado teor de sólidos solúveis está associado à boa qualidade do fruto. Os frutos, quando comparados com os produtos hortícolas, apresentam um maior teor de açúcares de baixa massa molecular (Quadro 5) (Martins & Empis, 2000).

Quadro 5 – Teores de glucose, frutose e sacarose (%) em frutos (Martins & Empis, 2000)

Fruto	Glucose	Frutose	Sacarose
Ananás	2,3	1,4	7,9
Banana	5,8	3,8	6,6
Cereja	5,5	6,1	0
Limão	0,5	0,9	0,2
Laranja	2,4	2,4	4,7
Maçã	1,8	5	2,4
Morango	2,6	2,3	1,3
Pêra	2,2	6	1,1
Pêssego	1,9	0,4	4,4
Uva	8,2	8	0

O amido é um polímero de elevada massa molecular presente nos frutos, e que constitui uma reserva energética (Wills *et al.*, 2007). Durante o amadurecimento de alguns frutos, como é o caso da pêra, ocorre a conversão do amido em açúcares mais simples (Castro-Giráldez *et al.*, 2010; Goulao *et al.*, 2010; Saquet & Almeida, 2016; Lombardi *et al.*, 2000) com consequente aumento do teor de sólidos solúveis.

Segundo Galvis-Shánchez *et al.* (2006), num estudo com pêra ‘Rocha’, verificou-se que o teor de sólidos solúveis (medido em graus brix) aumentou após 14 dias à temperatura ambiente. O mesmo comportamento se verificou num estudo de Coutinho *et al.* (2003) em peras cv. Carrick.

Num estudo com pêra 'Rocha', Saquet *et al.* (2017), verificaram que a aplicação imediata de AC com pressões de 0,5 kPa de O₂, e 0,6 kPa de CO₂, por 257 dias, foi bem sucedida quanto à manutenção das características de qualidade, nomeadamente a acidez, o teor de sólidos solúveis e a firmeza.

4.3.4 Fenóis

Os compostos fenólicos são responsáveis por conferir cor, sabor, aroma e adstringência, estando por isso associados à qualidade sensorial dos frutos (Degáspari & Waszczynskyj, 2004; Escarpa & González, 2001). Estes podem ser divididos em: flavonóides (ou polifenóis), ácidos fenólicos, isoflavonas e estilbenos (Almeida & Pintado, 2008).

A pêra 'Rocha' é rica em ácidos fenólicos nomeadamente ácidos hidroxicinâmicos (ácido clorogénico e ácido cafeíco) e flavonóides, em maior quantidade no epicarpo (Galvis-Shánchez *et al.*, 2006; Robards *et al.*, 1999), apresentando uma quantidade de compostos fenólicos totais naturais superior quando comparada com outras variedades de pêra (Salta *et al.*, 2010). A redução destes compostos pode, muitas vezes, estar associada ao aumento da actividade enzimática da PPO, como foi anteriormente referido.

Segundo um estudo de Galvis-Shánchez *et al.* (2006) sobre pêra 'Rocha', concluiu-se que, após 14 dias à temperatura ambiente, os compostos fenólicos presentes no epicarpo e mesocarpo da pêra, em geral decresceram. Isto sugere que a capacidade antioxidante diminuiu com o aumento do tempo de prateleira.

Fawole & Opara (2013) verificaram um decréscimo na quantidade de compostos fenólicos totais durante o processo de maturação de romãs. Este decréscimo está associado à oxidação dos fenóis pela polifenoloxidase à medida que o fruto vai amadurecendo, reduzindo a capacidade antioxidante deste.

4.3.5 Acidez

Os frutos apresentam em geral um pH ácido, sendo os três principais ácidos orgânicos presentes nos frutos o ácido málico, o ácido cítrico e o ácido tartárico (Quadro 6). Na pêra é o ácido málico que está presente em maior quantidade.

Quadro 6- Acidez titulável (%) e pH de alguns frutos (Martins & Empis, 2000)

Produto Hortofrutícola	Acidez titulável Total (%)	pH
Ameixa	1,5 (AM)	3,3
Ananás	1,1 (AC)	3,4
Banana	0,4 (AM)	4,7
Limão	6 (AC)	2,5
Maçã	0,6 (AM)	3,3
Pêra	0,2 (AM)	3,9
Pêssego	0,6 (AM)	3,7
Uva	0,4 (AT)	3,3

AM- Expresso em ácido málico; AC- Expresso em ácido cítrico; AT- Expresso em ácido tartárico.

Segundo Belitz *et al.* (2009) e Lombardi *et al.* (2000) em geral, durante o amadurecimento das peras, ocorre um decréscimo e estabilização da acidez. Por vezes, a redução da acidez pode ter um efeito negativo na qualidade organoléptica de alguns frutos, pois deve haver um equilíbrio entre a doçura e acidez (Brecht *et al.*, 2007). Outro efeito negativo da redução da acidez é o aumento da susceptibilidade a organismos patogénicos, uma vez que elevados níveis de acidez ajudam a controlar o desenvolvimento microbiano (Martins & Empis, 2000; Silva *et al.*, 2007).

Uma das causas da redução da acidez é que, durante a respiração, o fruto usa como substrato inicial os ácidos orgânicos. Só depois de estes serem consumidos é que são usados os açúcares (Saquet & Streif, 2017). Os processos de hidrólise, oxidação e fermentação podem modificar a concentração de iões de hidrogénio, com consequente alteração da acidez (Silva *et al.*, 2007).

Segundo Coutinho *et al.* (2003) num estudo de peras da cultivar Carrick, verificou-se que a acidez titulável diminuiu ligeiramente com o aumento do tempo à temperatura ambiente de 20°C. Silva *et al.* (2009), verificaram em pêra ‘Rocha’ que, de um modo geral, durante 6 meses em armazenamento em AC (2,5% O₂ e 0,7% CO₂), não houve alterações significativas no teor de sólidos solúveis, na firmeza e na acidez titulável.

Verificou-se assim nos estudos apresentados que a aplicação de AC adequada, por um longo período de tempo em geral foi eficaz na manutenção das características qualitativas das peras. Ao contrário com o aumento do tempo de prateleira verificam-se algumas alterações destes compostos, que podem relacionar-se com o processo natural de maturação e as reacções associadas a este.

DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

5. Materiais e métodos

5.1 Material vegetal e datas de análise

Foram utilizadas para este ensaio pêras da variedade 'Rocha' (*Pyrus communis* L. Rocha), provenientes de dois pomares localizados em zonas distintas da região Oeste: Mafra e Bombarral. Estes lotes são da campanha de 2016, e os frutos foram conservados numa central do grupo CPF, a -0,5°C, 90 a 95% de humidade relativa, em condições de atmosfera controlada dinâmica (0,5 % de O₂ e 0,5 % de CO₂).

Para cada pomar foram analisados lotes de 15 peras cada, em 5 datas com diferentes tempos de conservação em AC (t): os frutos foram avaliados à colheita (t₀), aos 57 dias (t₅₇), aos 99 dias (t₉₉), aos 158 dias (t₁₅₈) e aos 190 dias (t₁₉₀) de armazenamento em câmara de atmosfera controlada dinâmica (AC). Para cada tempo de conservação, foram analisadas amostras à saída da câmara (0 dias), uma semana após a saída da câmara (7 dias) e 14 dias após a saída da câmara (14 dias). Os primeiros 3 tempos de conservação após saída da câmara foram mantidos à temperatura de 9°C e os 2 últimos foram mantidos à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) (Nota: a temperatura de prateleira de 20°C foi solicitada por um dos parceiros do projecto).

5.2 Métodos Analíticos

Para cada lote de frutos foram realizadas análises químicas, físicas e bioquímicas. Nas análises químicas determinaram-se o teor de vitamina C/ácido ascórbico (mg/L sumo), a acidez titulável (g de ácido málico/ L sumo), o teor de fenóis totais (mg/L sumo). Nas análises físicas determinaram-se a firmeza (kg/0,5cm²) e o teor de sólidos solúveis (°Brix). Por fim, nas análises bioquímicas determinou-se um parâmetro indirecto da actividade das enzimas PPO e ADH. Procedeu-se também à determinação do teor de proteína solúvel total para posterior normalização da actividade enzimática das enzimas ADH e PPO. O protocolo detalhado encontra-se descrito no ANEXO I.

5.2.1 Determinação da firmeza

A firmeza da polpa foi determinada recorrendo a um penetrómetro manual (FT-327) com sonda de prova de 0,5 cm de diâmetro.

5.2.2 Acidez Titulável (AT)

Para a determinação da acidez titulável, foi feita uma titulação potenciométrica segundo a norma portuguesa NP-1421 (1977) com ligeiras alterações: utilizaram-se 10 mL de sumo previamente filtrado, perfazendo 20 mL com água destilada. Esta solução de 20 mL é depois titulada com hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1N, com auxílio do potenciómetro e eléctrodo (Modelo pH 213) até atingir-se o pH 8,15. A acidez titulável é expressa pela concentração de ácido málico (g/L).

5.2.3 Teor de fenóis totais

Para a determinação do teor de fenóis totais, expressos em ácido gálico, utilizou-se o método de espectrofotometria descrito por Waterhouse (2003), fazendo-se uma diluição de 1:20 do sumo em água destilada, e posterior leitura directa no espectrofotómetro (Modelo GeneQuant Pro) a um comprimento de onda de 280 nm.

5.2.4 Teor de Sólidos Solúveis (TSS)

Na determinação do teor de sólidos solúveis em graus Brix (g de sólidos solúveis por 100 g de amostra), utilizou-se o método de refractometria, através do refractómetro digital (modelo HI 96801).

5.2.5 Vitamina C (Ácido ascórbico)

Para a medição da vitamina C utilizou-se o método volumétrico desenvolvido por Tillmans (1927) com a solução oxidante de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) como titulante, utilizado por Oliveira *et al.* (2010), com algumas adaptações. Todos os dias de ensaio foi feita uma titulação de padrão de ácido ascórbico. As amostras de sumo de pêra foram apenas diluídas com água. Um dos problemas que surgiu nesta metodologia foi o facto das amostras de sumo de pêra 'Rocha' apresentarem reduzidas quantidades de vitamina C, e deste modo utilizariam um baixo volume de DCPIP para uma titulação feita em bureta. Como tal,

adaptou-se uma nova metodologia em que em vez de buretas utilizam-se micropipetas (0 - 5000 μL), avaliando-se a massa de DCPIP adicionada, recorrendo-se à densidade de DCPIP para os cálculos subsequentes.

5.2.6 Quantificação de proteína solúvel total

Para a determinação do teor de proteína total recorreu-se ao método de Bradford (1976), onde se utiliza o corante 'Coomassie Brilliant Blue G-250', adicionando-se 20 μL de sumo a 1000 μL de reagente de Bradford. Procedeu-se à leitura das respectivas absorvâncias a 595 nm no espectrofotómetro (Modelo GeneQuant Pro). Para quantificação final de proteína recorreu-se à curva de calibração que foi obtida utilizando-se como padrão a proteína de soro de albumina bovina (BSA) com as seguintes concentrações: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 e 0.6 (mg mL^{-1}).

5.2.7 Determinação indirecta de actividade da PPO

A actividade da PPO foi determinada indirectamente com base no método descrito por Ngadze *et al.* (2012) com algumas modificações nas quantidades: utilizou-se 250 μL de sumo, 725 μL de tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 6) e 250 μL de catecol 0,1M. Foram lidas as respectivas absorvâncias a 546 nm no espectrofotómetro (Shimadzu UV-1200) durante 90 minutos, para diferentes intervalos de tempo (0, 5, 12, 40, 60 e 90 minutos). A actividade foi avaliada indirectamente pelo aumento da absorvância ao longo do tempo, calculando-se a variação total de absorvância nos 90 min por mg de proteína.

5.2.8 Determinação indirecta de actividade da ADH

A actividade da enzima também foi determinada indirectamente pelo método de espectrofotometria com base no método descrito por Ke *et al.* (1994). A oxidação do NADH foi medida através da diminuição da absorvância a 340 nm usando o referido espectrofotómetro. Foram lidas absorvâncias durante 4 horas (com intervalos de 1 hora). A actividade da ADH foi avaliada indirectamente, pela descida da absorvância desde a medição inicial até ao menor valor, reportando também à quantidade de proteína.

5.2.9 Acastanhamento Interno

A avaliação da incidência de acastanhamento interno foi feita visualmente, aquando o corte para extracção do sumo. Não foi avaliado o grau de severidade de acastanhamento, apenas se observou se o fruto estava ou não afectado internamente. No final calculou-se a percentagem de frutos afectados por este problema.

5.3 Análise de dados: métodos estatísticos

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de 5%, para testar se os resultados apresentaram diferenças significativas entre eles. Para comparações de médias foram realizados testes de Tukey ($\alpha=0,05$) utilizando o programa estatístico 'R-project v. 3.2.2' (<https://cran.r-project.org>).

6. Resultados e Discussão

6.1 Evolução dos parâmetros de qualidade durante o armazenamento em regime de AC

Neste ensaio pretendeu-se avaliar o comportamento da pêra 'Rocha' por um período prolongado de atmosfera controlada dinâmica (190 dias), proveniente de dois pomares distintos: Bombarral e Maфра. Os dois pomares correspondem a condicionalismos produtivos distintos, dos quais não se conhecem todas as características. Assim, a análise dos resultados considerará os pomares individualmente, estabelecendo-se alguma comparação pontualmente, se se justificar. Primeiramente foram analisadas as três características mais comumente utilizadas na avaliação da qualidade da pêra: a firmeza, o teor de sólidos solúveis (TSS) e a acidez titulável (AT) (Quadro 7), à saída da câmara.

Quadro 7- Valores médios de firmeza, teor de sólidos solúveis (TSS) e acidez titulável (AT) avaliados a cada data de saída da câmara, para os dois pomares.

Local	Tempo de conservação (dias)	Firmeza (kg 0,5 /cm ²)	TSS (°Brix)	AT (g ác. málico L ⁻¹ sumo)
Bombarral	t ₀	5,143 a	11,387 c	1,197 a
	t ₅₇	4,797 ab	12,233 ab	0,491 d
	t ₉₉	5,217 a	11,413 bc	0,791 bc
	t ₁₅₈	4,460 b	12,167 abc	0,545 cd
	t ₁₉₀	4,940 ab	12,293 a	0,969 ab
Maфра	t ₀	4,963 A	11,167 B	1,170 A
	t ₅₇	5,223 A	11,833 AB	0,701 B
	t ₉₉	5,137 A	11,533 AB	0,907 AB
	t ₁₅₈	4,083 B	11,800 AB	0,719 B
	t ₁₉₀	4,917 A	12,060 A	0,947 AB

Foram comparadas as médias ao longo do tempo (de cada coluna) separando as médias de cada pomar: o Bombarral com letras minúsculas e Maфра com letras maiúsculas. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=15 peras).

À saída da câmara os valores médios da firmeza pouco variaram entre datas, sendo o menor valor 4,08 kg/0,5cm², e 5,22 kg/0,5 cm² o valor máximo, nos dois pomares. Este resultado foi de encontro ao observado em estudos anteriores de Martin *et al.* (2015) e Silva *et al.* (2009), quanto à manutenção da firmeza das peras armazenadas por um longo período de tempo em AC. A conservação em AC foi eficaz na preservação da firmeza das peras ao longo dos 190 dias de armazenamento. Algumas oscilações verificadas deverão estar relacionadas com a variabilidade intrínseca da amostragem.

Pela leitura do quadro anterior, pode observar-se que o valor médio do teor de sólidos solúveis não apresentou diferenças significativas entre quaisquer duas datas sucessivas, excepto entre a data t_0 e t_{57} do pomar do Bombarral. Quando comparadas a primeira e a última datas, verificou-se um aumento significativo, para ambos os pomares, sendo o valor médio máximo obtido 12,29 °Brix, no pomar do Bombarral e 12,08 °Brix no de Mafra. Em estudos anteriores de Silva *et al.* (2009) verificou-se um comportamento estável do teor de sólidos solúveis de peras ao longo do armazenamento em AC durante 6 meses. Apesar destes resultados, Saquet *et al.* (2017), num ensaio com pêra 'Rocha' verificaram um aumento do TSS, durante um armazenamento prolongado de 257 dias numa atmosfera com 0,5 kPa O₂ e 0,6 kPa de CO₂, corroborando os resultados aqui obtidos. Este aumento deverá estar relacionado com a conversão do amido em açúcares mais simples que terá ocorrido, embora não de forma muito intensa.

Quanto à acidez titulável média, no pomar do Bombarral, entre cada data houve aumentos e decréscimos sem evidenciarem uma tendência concreta em função do tempo em AC. Nas peras do pomar de Mafra da primeira data (t_0) para a segunda (t_{57}) houve uma diminuição significativa da acidez média, mas nos restantes tempos de conservação esta manteve-se sem diferenças significativas entre elas. As peras que apresentaram maior valor médio de acidez foram as da 1ª data (t_0), com 0 dias de armazenamento, sendo 1,197 g e 1,170 g ácido málico L⁻¹ para o pomar do Bombarral e Mafra, respectivamente. Existe uma diferença significativa entre a acidez das peras do pomar do Bombarral e as de Mafra, sendo esta maior nas de Mafra (valores não apresentados). No estudo de Silva *et al.* (2009) não se verificaram variações significativas da acidez titulável em função do tempo de armazenamento. Saquet *et al.* (2017) verificaram um decréscimo da acidez titulável, em peras com 257 dias de armazenamento em AC. Os resultados aqui obtidos vão ao encontro dos trabalhos anteriores; não havendo diferenças muito significativas, há uma certa tendência para a AT média diminuir, com algumas oscilações provavelmente devidas à amostragem.

Observando ainda o quadro 7, verifica-se que no pomar do Bombarral, valores médios da acidez mais baixos (0,491 e 0,545 g ácido málico L⁻¹ sumo) correspondem a valores médios

de TSS mais elevados (12,23 e 12,12 °Brix) e a valores mais baixos de firmeza (4,797 e 4,460 kg/0,5cm²) indiciando globalmente maturação mais avançada. Esta relação não é evidente no pomar de Mafra.

6.2 Evolução dos parâmetros de qualidade durante 0, 7 e 14 dias de prateleira

Seguidamente estudou-se a evolução dos parâmetros de qualidade, durante 14 dias de prateleira à temperatura de refrigeração de 9°C e, a 20°C para as peras que estiveram 158 e 190 dias em câmara (a temperatura de prateleira de 20°C foi solicitada por um dos parceiros do projecto). Nos Quadros 8, 9 e 10 são apresentados os valores médios da firmeza, teor de sólidos solúveis (TSS) e acidez titulável (AT).

Quadro 8 – Valores de firmeza média (kg/0,5cm²) analisados, nos seguintes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.

Local	Firmeza (kg/0,5cm ²)					
	Tempo de prateleira (dias)	t ₀ (0 dias)	t ₅₇ (57 dias)	t ₉₉ (99 dias)	*t ₁₅₈ (158 dias)	*t ₁₉₀ (190 dias)
Bombarral	0	5,143 a	4,797 a	5,217 a	4,460 a	4,940 a
	7	4,920 a	4,377 a	4,703 b	0,800 b	0,887 b
	14	2,143 b	3,307 b	3,430 c	0,190 c	0,327 c
Mafra	0	4,963 A	5,223 A	5,137 A	4,083 A	4,917 A
	7	4,877 A	4,223 B	4,970 A	0,867 B	0,723 B
	14	2,287 B	2,920 C	3,710 B	0,240 C	0,153 C

*As peras das datas t₁₅₈ e t₁₉₀ após saída da câmara foram mantidas à temperatura ambiente (20°C) e as restantes a 9°C.

Foram comparadas as médias de cada coluna separando as médias de cada pomar: o Bombarral com letras minúsculas e Mafra com letras maiúsculas. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=15 peras).

Verificou-se um comportamento tendencialmente negativo da firmeza média ao longo dos 14 dias de prateleira, semelhante nas peras do Bombarral e de Mafra. Ainda a partir dos dados analisados, observa-se que as peras mantidas a 20°C (das 2 últimas datas) revelaram uma perda de firmeza muito mais acelerada ao fim de 7 dias, quando comparadas com as outras mantidas a 9°C, provavelmente devido a uma muito maior intensidade dos processos metabólicos. Estes lotes de peras apresentaram firmezas mínimas próximas de 0 kg/0,5cm²

após 14 dias fora da câmara, indiciando que 14 dias a 20°C é um período demasiado longo, comprometendo a qualidade comercial das peras. Estes resultados vão de encontro aos obtidos por Galvis-Shánchez & Morais (2002) e de Oliveira *et al.* (2014).

Quadro 9 – Valores do Teor de Sólidos Solúveis médios (°Brix) analisados nos seguintes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.

Local	TSS (° Brix)					
	Tempo de prateleira (dias)	t ₀ (0 dias)	t ₅₇ (57 dias)	t ₉₉ (99 dias)	*t ₁₅₈ (158 dias)	*t ₁₉₀ (190 dias)
Bombarral	0	11,387 b	12,233 a	11,413 a	12,167 a	12,293 b
	7	12,080 ab	11,907 ab	11,953 a	12,527 a	13,107 a
	14	12,307 a	11,313 b	11,620 a	12,540 a	13,453 a
Mafra	0	11,167 A	11,833 A	11,533 A	11,800 B	12,060 B
	7	11,407 A	11,967 A	11,520 A	12,813 A	12,647 A
	14	11,713 A	11,680 A	11,547 A	12,673 A	12,673 A

*As peras das datas t₁₅₈ e t₁₉₀ após saída da câmara foram mantidas à temperatura ambiente (20°C) e as restantes a 9°C.

Foram comparadas as médias de cada coluna separando as médias de cada pomar: o Bombarral com letras minúsculas e Mafra com letras maiúsculas. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=15 peras).

O valor médio do teor de sólidos solúveis (TSS) manteve-se entre os 11,167 (valor mínimo) e 12,307 °Brix (valor máximo) nas peras mantidas a 9°C, do Bombarral e Mafra. Comparando o TSS médio para cada situação de peras a 9°C, as únicas diferenças significativas foram dos 0 dias para os 14 dias de prateleira, nos t₀ e t₅₇ do Bombarral, não havendo alterações significativas entre os restantes tempos. Em contrapartida, as datas do t₁₅₈ (excepto o lote de peras do Bombarral) e t₁₉₀ mantidas a 20°C revelaram um aumento significativo do TSS médio nos primeiros 7 dias fora da câmara. As peras mantidas a 20°C tiveram no geral uma evolução do TSS médio superior às peras mantidas à temperatura de refrigeração de 9°C, considerando por isso que tiveram um processo de maturação também mais rápido. Em estudos anteriores de Galvis-Shánchez *et al.* (2006) e Saquet *et al.* (2017), verificaram o mesmo comportamento em peras mantidas a 18-20°C, durante 8 e 7 dias, respectivamente.

Observando os dois quadros anteriores, os valores médios de firmeza e TSS relacionam-se, sendo que amostras com menor firmeza apresentam maior teor de sólidos solúveis (°Brix)

no caso das peras mantidas a 20°C durante os 14 dias, resultado de uma maior actividade metabólica.

Quadro 10 – Valores de Acidez Titulável média (g ácido málico L⁻¹ sumo) analisados nos seguintes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.

Local	AT (g ácido málico L ⁻¹ sumo)					
	Tempo de prateleira (dias)	t ₀ (0 dias)	t ₅₇ (57 dias)	t ₉₉ (99 dias)	*t ₁₅₈ (158 dias)	*t ₁₉₀ (190 dias)
Bombarral	0	1,197 a	0,491 b	0,791 a	0,545 c	0,969 a
	7	0,893 b	1,059 a	0,786 a	0,992 b	0,880 a
	14	0,670 b	1,001 a	0,679 a	1,385 a	0,782 a
Mafra	0	1,170 A	0,701 B	0,907 A	0,719 C	0,947 B
	7	1,023 A	1,041 A	0,612 B	1,081 B	0,889 B
	14	0,936 A	1,170 A	0,755 AB	1,273 A	1,161 A

*As peras das datas t₁₅₈ e t₁₉₀ após saída da câmara foram mantidas à temperatura ambiente (20°C) e as restantes a 9°C.

Foram comparadas as médias de cada coluna separando as médias de cada pomar: o Bombarral com letras minúsculas e Mafra com letras maiúsculas. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=15 peras).

Pela observação do quadro 10, os valores médios de acidez obtidos nas análises foram em geral baixos, encontrando-se abaixo dos valores mínimos das especificações técnicas da pêra 'Rocha' (ANP, 2009).

No geral, o valor médio da acidez titulável variou nos primeiros 7 dias de prateleira a 9°C, mantendo-se depois constante dos 7 aos 14 dias, não revelando diferenças significativas. Em contrapartida nas peras que permaneceram mais tempo em câmara de AC, durante o tempo de prateleira a 20°C, no geral, verificou-se um aumento significativo da acidez média com o aumento do tempo de prateleira. Este resultado não é congruente com o que foi anteriormente referido por autores, uma vez que no processo normal de maturação destes frutos, a acidez geralmente apresenta um comportamento decrescente, em que os ácidos são normalmente consumidos durante o processo respiratório do fruto. Este comportamento decrescente verificou-se em estudos com pêra 'Rocha' de Saquet *et al.* (2017) durante um período de prateleira de 7 dias. Uma das causas que pode ter originado valores tão distintos da acidez pode ter sido o processo de trituração dos frutos em sumo. O processo de trituração não é totalmente homogêneo, podendo haver constituintes que não são extraídos com a mesma eficiência em todos os sumos. Não é também de excluir alguma heterogeneidade intrínseca ao pomar reflectida nas diferentes amostras.

6.3 Evolução de enzimas oxidativa (PPO) e fermentativa (ADH), do teor de fenóis totais e do teor de vitamina C

Foram determinados parâmetros relacionados com a actividade das enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo (PPO) e metabolismo fermentativo (ADH), o teor de fenóis totais e o teor de vitamina C (Quadros 11,12,13 e 14).

Quadro 11 – Valores médios da variação da medição indirecta da actividade da PPO ($\Delta\text{Abs}_{546}/\text{mg}$ proteína) após diferentes tempos de câmara e subsequentes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.

Local	PPO ($\Delta\text{Abs}_{546}/\text{mg}$ proteína)					
	Tempo de prateleira (dias)	t ₀ (0 dias)	t ₅₇ (57 dias)	t ₉₉ (99 dias)	*t ₁₅₈ (158 dias)	*t ₁₉₀ (190 dias)
Bombarral	0	3,113 a B	13,806 a A	7,552 a B	4,600 b B	6,162 b B
	7	3,631 a	9,878 ab	5,219 a	9,690 b	7,992 b
	14	4,243 a	7,629 b	14,477 a	32,730 a	13,262 a
Mafra	0	6,541 a B	27,225 a A	12,284 a B	5,610 c B	8,978 a B
	7	6,833 a	15,687 a	12,809 a	11,870 b	12,483 a
	14	10,159 a	16,789 a	8,001 a	27,160 a	11,477 a

*As peras das datas t₁₅₈ e t₁₉₀ após saída da câmara foram mantidas à temperatura ambiente (20°C) e as restantes a 9°C.

As comparações entre médias foram feitas separadamente para cada local. Assim para o pomar do Bombarral médias da mesma coluna são representadas com letras minúsculas, e médias da mesma linha por letras maiúsculas. O mesmo procedimento foi seguido para o local Mafra. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=15 peras).

A perda de integridade das membranas, como referido, pode originar um aumento da actividade enzimática, uma vez que as enzimas oxidativas, entre elas a PPO entram em contacto com os compostos fenólicos (principais substratos desta reacção). A conservação em AC dinâmica contribui para minimizar estas reacções do metabolismo oxidativo, que são uma das causas dos distúrbios relacionados com o acastanhamento. Pela análise do quadro 11, a actividade da PPO mantém-se sem alterações significativas ao longo do tempo de armazenamento, para um tempo de prateleira de 0 dias, verificando-se maior actividade nas peras com 57 dias em AC (t₅₇). Quanto à evolução em prateleira, a actividade da PPO revela uma tendência, nem sempre muito consistente, para ir aumentando. Esta tendência é mais monótona dos 7 para os 14 dias nas peras mantidas a 20°C, nas duas últimas datas de

saída da câmara (158 e 190 dias). Estes resultados coincidem com a redução dos valores médios da firmeza (quadro 8) nestas duas últimas datas.

Quadro 12 – Valores médios da variação da medição indirecta da actividade da ADH ($\Delta\text{Abs}_{340}/\text{mg}$ proteína) após diferentes tempos de câmara e subsequentes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.

Local	ADH ($\Delta\text{Abs}_{340}/\text{mg}$ proteína)					
	Tempo de prateleira (dias)	t ₀ (0 dias)	t ₅₇ (57 dias)	t ₉₉ (99 dias)	*t ₁₅₈ (158 dias)	*t ₁₉₀ (190 dias)
Bombarral	0	4,580 a BC	9,205 ab B	16,635 a A	5,078 a BC	0,313 c C
	7	3,071 a	11,066 a	5,176 b	1,886 b	4,240 a
	14	1,869 a	2,134 b	11,466 ab	1,332 b	3,359 b
Mafra	0	3,421 a B	9,951 a B	23,773 a A	4,172 a B	0,312 c B
	7	2,859 a	7,339 a	14,246 ab	0,623 b	7,269 a
	14	3,001 a	6,559 a	7,320 b	1,213 b	2,398 b

*As peras das datas t₁₅₈ e t₁₉₀ após saída da câmara foram mantidas à temperatura ambiente (20°C) e as restantes a 9°C.

As comparações entre médias foram feitas separadamente para cada local. Assim para o pomar do Bombarral médias da mesma coluna são representadas com letras minúsculas, e médias da mesma linha por letras maiúsculas. O mesmo procedimento foi seguido para o local Mafra. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=15 peras).

A conservação prolongada em AC quando em condições não adequadas, como por exemplo concentrações demasiado baixas de O₂ e muito altas de CO₂, pode gerar nas peras situações de hipoxia e consequente respiração anaeróbia e fermentação no seu interior. Uma das enzimas envolvidas no processo fermentativo é a álcool desidrogenase (ADH). Uma forma de avaliar a incidência de fermentação nas peras é a quantificação da actividade desta enzima. Segundo um estudo com peras ‘Blanquilla’, Pintó *et al.* (2001) verificaram que a actividade da álcool desidrogenase (ADH) aumentou consideravelmente nos frutos armazenados por longos períodos de tempo (6 meses) a 2% de O₂ e 5% de CO₂. Ke *et al.* (1994) verificaram em peras ‘Barlett’ o aumento da actividade da ADH para atmosferas ricas em CO₂ e fora da câmara à temperatura ambiente. O mesmo não se verificou neste estudo, pela análise do quadro 12, não houve uma variação tendencial significativa na média da medição indirecta da actividade da ADH, para o aumento do tempo em câmara e do tempo de prateleira, nos dois pomares. Portanto, com estes resultados é deduzida a hipótese de

que as peras analisadas não se encontravam em processo fermentativo crescente. Comparando a actividade (medida indirectamente) desta enzima com a da PPO, verifica-se que valores mais elevados da actividade média da PPO correspondem a valores mais elevados da actividade média da ADH, para peras mantidas a 9°C, podendo indicar maior *stress*. Estes resultados podem dever-se ao maior ou menor teor proteico dos sumos utilizados nas análises de peras. Os valores mais baixos da actividade média da ADH nas duas últimas datas, aos 7 e 14 dias, podem estar relacionados com o estado degradado em que se encontravam as peras no momento de análise. As peras estavam já demasiado ‘amolecidas’, podendo já ter parte do conteúdo proteico sido degradado, e com subsequente perda da actividade enzimática desta enzima.

Quadro 13 – Valores médios do teor de fenóis (mg L⁻¹sumo) após diferentes tempos de câmara e subsequentes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.

Local	Fenóis					
	Tempo de prateleira (dias)	t ₀ (0 dias)	t ₅₇ (57 dias)	t ₉₉ (99 dias)	*t ₁₅₈ (158 dias)	*t ₁₉₀ (190 dias)
Bombarral	0	286,0 a AB	257,7 a AB	177,8 a C	248,6 a B	302,0 a A
	7	300,0 a	212,5 b	189,3 a	249,0 a	291,9 a
	14	328,3 a	245,5 ab	179,7 a	246,1 a	274,6 a
Mafra	0	285,2 a A	244,5 a AB	180,0 a C	203,7 b BC	243,8 b AB
	7	283,7 a	196,8 b	181,5 a	251,5 a	265,2 ab
	14	296,7 a	242,4 a	194,8 a	275,5 a	284,6 a

*As peras das datas t₁₅₈ e t₁₉₀ após saída da câmara foram mantidas à temperatura ambiente (20°C) e as restantes a 9°C.

As comparações entre médias foram feitas separadamente para cada local. Assim, para o pomar do Bombarral médias da mesma coluna são representadas com letras minúsculas, e médias da mesma linha por letras maiúsculas. O mesmo procedimento foi seguido para o local Mafra. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=15 peras).

O teor médio de fenóis praticamente não variou ao longo do tempo de prateleira, tanto no Bombarral como em Mafra. Não existe também um comportamento monótono com o aumento do tempo em câmara, sendo que os valores mínimos de fenóis verificaram-se aos 99 dias. Segundo um estudo de Galvis-Shánchez *et al.* (2006) sobre pêra ‘Rocha’, concluiu-se que após 14 dias à temperatura ambiente, os compostos fenólicos presentes no epicarpo e mesocarpo da pêra, em geral decresceram. Isto sugere que a capacidade antioxidante

diminuiu com o aumento do tempo de prateleira. Noutro estudo com romãs, Fawole & Opara (2013) verificaram o mesmo comportamento, durante o processo de maturação. O mesmo não se verificou neste ensaio com pêra ‘Rocha’. O teor médio de fenóis estável sugere que o sistema antioxidante de defesa se manteve estável, não tendo sido influenciado pelo factor tempo. Uma das razões que normalmente provoca o decréscimo do teor de fenóis durante a conservação e maturação da pêra, é a oxidação dos fenóis pela PPO à medida que o fruto vai amadurecendo, reduzindo a capacidade antioxidante deste. O facto de não ter havido variações muito notórias na medição da actividade da PPO suporta esta estabilidade verificada nos teores em fenóis totais.

Quadro 14 – Valores médios do teor de vitamina C (mg L⁻¹ sumo) após diferentes tempos de câmara e subsequentes tempos de prateleira: 0, 7 e 14 dias, para peras de Mafra e Bombarral.

Local	Vitamina C					
	Tempo de prateleira (dias)	t ₀ (0 dias)	t ₅₇ (57 dias)	t ₉₉ (99 dias)	*t ₁₅₈ (158 dias)	*t ₁₉₀ (190 dias)
Bombarral	0	9,653 a BC	14,001 a A	8,723 a C	9,903 a BC	12,864 a AB
	7	10,631 a	8,504 b	8,520 a	11,282 a	8,807 b
	14	12,672 a	12,285 a	10,374 a	7,295 b	7,152 c
Mafra	0	10,36 a ABC	12,084 a AB	9,073 a C	9,402 a BC	13,071 a A
	7	8,762 a	9,035 b	10,042 a	7,522 b	8,597 b
	14 dias	10,827 a	11,301 ab	9,877 a	7,749 ab	6,954 b

*As peras das datas t₁₅₈ e t₁₉₀ após saída da câmara foram mantidas à temperatura ambiente (20°C) e as restantes a 9°C.

As comparações entre médias foram feitas separadamente para cada local. Assim para o pomar do Bombarral médias da mesma coluna são representadas com letras minúsculas, e médias da mesma linha por letras maiúsculas. O mesmo procedimento foi seguido para o local Mafra. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (n=15 peras)

Os valores médios de teor de vitamina C não revelaram diferenças significativas ao longo dos 14 dias de prateleira, nas peras mantidas a 9°C, do Bombarral e de Mafra. Nas peras que estiveram a 20°C fora da câmara, em geral o teor médio de vitamina C diminui. Não se verificou qualquer relação entre a variação do teor de vitamina C e o aumento do tempo em AC para um tempo de prateleira de 0 dias. Segundo Davey *et al.* (2000), não existe um comportamento definido sobre o efeito da maturação na evolução da quantidade de ácido ascórbico nos frutos. Outros autores, Kader & Lee (2000), Lum *et al.* (2017), Silva *et al.* (2009), e Veltman *et al.* (2002) verificaram uma descida da concentração de ácido ascórbico ao longo da conservação em atmosfera controlada.

Em geral os teores baixos de vitamina C verificados, podem relacionar-se com factores intrínsecos a cada pêra, mas também podem dever-se à excessiva duração do período de congelação dos sumos, bem como ao próprio processo de congelação e descongelação dos mesmos, para se proceder às análises.

Verifica-se ainda que, à saída da câmara aos 99 dias, as peras de ambos os pomares apresentavam o teor médio mínimo de vitamina C, correspondendo a um teor médio de fenóis também mais baixo (quadro 13).

O decréscimo do teor médio de vitamina C nas duas últimas datas, durante os 14 dias a 20°C poderá relacionar-se com o aumento da actividade da PPO, também nestas duas datas. Muitas vezes, o aumento da actividade da PPO aparece associado à diminuição dos componentes responsáveis por evitar as oxidações, como é o caso do ácido ascórbico (vitamina C). Num estudo com algumas variedades de pêra conservadas durante 90 dias em câmara refrigerada a 1°C, Saba & Moradi (2016) verificaram um aumento da actividade da PPO. Em contrapartida a concentração de ácido ascórbico diminuiu, assim como o teor de fenóis totais.

6.4 Incidência de desordens relacionadas com o acastanhamento interno

Como último objectivo, pretende-se determinar a incidência de acastanhamento interno em função do tempo de armazenamento em câmara e tempo de prateleira, e verificar se existe alguma relação deste acidente com as variáveis químicas e bioquímicas anteriormente analisadas. Na figura 8 apresentam-se alguns exemplos de registos desta desordem durante os ensaios.

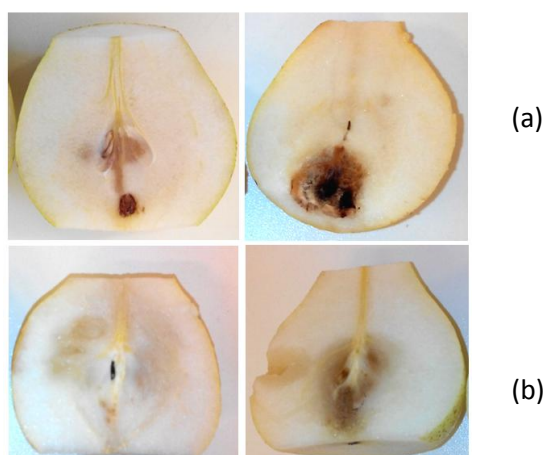


Figura 8 - Peras com acastanhamento interno: (a) '*brown heart*' (b) '*core browning*'

O aparecimento de acastanhamento interno na pêra (%) foi avaliado pela quantidade de frutos que apresentavam qualquer tipo de escurecimento, em cada lote de 30 frutos, não tendo sido aplicada nenhuma escala de severidade desta desordem. No quadro seguinte apresentam-se as percentagens de peras afectadas com acastanhamento interno, ao longo de todos os tempos de armazenamento (t_0 , t_{57} , t_{99} , t_{158} e t_{190}) e tempos de prateleira (0, 7 e 14 dias).

Quadro 15 – Avaliação da incidência de acastanhamento interno (%) nos lotes de peras analisados (avaliação global dos dois pomares)

Tempo de armazenamento (dias em AC)	Tempo de Prateleira (dias fora da câmara)	Nº de peras com Acastanhamento interno	% de Acastanhamento
t_0 (0 dias)	0	0	0%
	7	0	0%
	14	0	0%
t_{57} (57 dias)	0	0	0%
	7	2	7%
	14	0	0%
t_{99} (99 dias)	0	0	0%
	7	0	0%
	14	0	0%
t_{158} (158 dias)	*0	0	0%
	*7	1	3%
	*14	2	6%
t_{190} (190 dias)	*0	9	30%
	*7	5	17%
	*14	7	23%

*As peras das datas t_{158} e t_{190} após saída da câmara foram mantidas à temperatura ambiente (20°C) e as restantes a 9°C (n=30 peras).

Pela análise do quadro 15, verifica-se que as peras apresentaram incidência total de 5,8% desta desordem, sendo que a última data de ambos os pomares, após 190 dias de armazenamento em AC, foi a que se destacou com este problema, em 30%, 17% e 23% à saída da câmara, aos 7 dias e 14 dias fora da câmara, respectivamente.

Como foi referido anteriormente, o acastanhamento interno é uma desordem que afecta a qualidade dos frutos, em que vários factores podem estar na sua origem. Duas das causas apresentadas foram a acção oxidativa das enzimas como a PPO, e outra, o metabolismo fermentativo, que poderá ser causado pelas condições anóxicas em câmara e excesso de CO₂. Tentando verificar se existe alguma relação entre o aparecimento desta desordem na

5ª data de análise (t_{190}) e as análises realizadas, observou-se primeiramente, se existia alguma relação com a actividade da ADH (quadro 12), não se encontrando qualquer relação, que possa justificar a maior incidência de acastanhamento interno. Deste modo, a hipótese de que as peras com este distúrbio se encontravam em processo de fermentação mais acentuado, não se confirmou.

Num estudo com algumas variedades de pêra iranianas, já referido, Saba & Moradi (2016) verificaram que o aumento da actividade da PPO relacionava-se positivamente com o aumento da incidência de acastanhamento interno. Em contrapartida a concentração de ácido ascórbico diminui, assim como o teor de fenóis totais, diminuindo a capacidade antioxidante das peras. Este ensaio está de acordo com os resultados obtidos quanto à evolução da actividade da PPO e do teor médio de ácido ascórbico nos dois últimos tempos de conservação, uma relação inversa. No entanto, não existe nenhuma alteração significativa no teor de fenóis, e também não se consegue encontrar uma relação visível com a maior incidência de acastanhamento nestes últimos lotes.

Ainda neste estudo, de Saba & Moradi (2016), que faz referência a oito cultivares diferentes de peras, verifica-se que, apesar de aumentar consistentemente a incidência de acastanhamento interno ao longo da conservação, a susceptibilidade varia de cultivar para cultivar, sendo maior numas e menor noutras. Essa diferença depende em grande parte da composição variável das peras, nomeadamente da sua actividade enzimática e componente bioactiva, que são influenciadas essencialmente por factores genéticos e também por condições climáticas. Apesar das variedades entre si diferirem quanto ao teor de fenóis, ácido ascórbico, e PPO, verifica-se que estas têm uma evolução semelhante destes parâmetros ao longo do tempo de armazenamento. Em geral a incidência média de acastanhamento interno aumentou cerca de 13% por mês, durante o armazenamento prolongado.

7. Conclusão

Este trabalho teve como objectivos o estudo da evolução do comportamento da pêra 'Rocha', durante o armazenamento prolongado (190 dias) em atmosfera controlada dinâmica, bem como durante o período de prateleira de 0, 7 e 14 dias e a ainda verificar a incidência de acastanhamento interno e se existe alguma relação com os parâmetros analisados. Para tal, procedeu-se ao estudo dos parâmetros de qualidade mais comuns nesta área: firmeza, teor de sólidos solúveis, acidez titulável, e também a determinações de vitamina C, teor de fenóis totais e de enzimas relacionadas com os metabolismos oxidativo (PPO) e fermentativo (ADH). Analisou-se também a presença de acastanhamento interno nos frutos.

As análises incidiram sobre dois pomares (Bombarral e Mafra) para aferir se os diferentes condicionalismos produtivos influenciaram diferencialmente os parâmetros em avaliação. Tal não se verificou, salvo excepções pontuais, os comportamentos foram sobreponíveis (os valores absolutos foram diferentes, o que decorre de serem pomares diferentes, mas as evoluções globalmente foram semelhantes).

Face aos resultados obtidos, pode concluir-se que, no geral, a conservação prolongada de pêra 'Rocha' em atmosfera controlada dinâmica com 0,5% de O₂ e 0,5% de CO₂, a -0,5°C, não teve um impacto negativo, verificando-se a manutenção dos parâmetros de qualidade analisados, nomeadamente a firmeza, teor de sólidos solúveis e acidez titulável, nos dois pomares distintos, Bombarral e Mafra.

O tempo de prateleira de 14 dias provocou um declínio da firmeza média das peras, destacando-se com maior relevância nas peras mantidas à temperatura de aproximadamente 20°C, sendo evidente o efeito da temperatura nos processos de maturação das peras. O teor de sólidos solúveis manteve-se praticamente constante ao longo dos 14 dias de prateleira, com excepção das peras mantidas a 20°C onde se verificou o aumento significativo destes, nas peras de ambos os pomares. Contrariamente, a acidez titulável média apresentou um comportamento inconstante, sendo que nas peras mantidas a 20°C verificou-se um aumento da acidez média. Vários factores podem estar na origem deste aumento, como por exemplo a extracção mais eficiente de alguns compostos do sumo após trituração, aumentando a disponibilidade dos ácidos. Outra causa possível seria a heterogeneidade intrínseca ao pomar reflectida nas diferentes amostras. Esta heterogeneidade é ainda ampliada pelo facto de se avaliarem as peras individualmente, aumentando consideravelmente a variabilidade dos resultados.

Quanto aos parâmetros associados ao sistema antioxidante (fenóis e vitamina C), concluiu-se que estes não revelaram um comportamento crescente ou decrescente com o aumento do tempo de armazenamento em câmara de AC, nos dois pomares, podendo sugerir que os frutos não se encontravam em *stress*. Foram também avaliados parâmetros relativos ao metabolismo oxidativo da PPO e fermentativo da ADH que também apresentaram uma evolução sem uma tendência clara ao longo do tempo em câmara. Verificou-se um aumento da actividade indirecta da PPO com o aumento do tempo de prateleira, nas amostras que permaneceram a 20°C. Estes valores coincidiram com uma redução do teor de vitamina C, também nestes lotes.

Concluiu-se que a percentagem de incidência de acastanhamento interno total nos dois pomares, foi baixa (5,7%), sendo o maior valor verificado na última data de análise (190 dias), à saída da câmara, após 7 e 14 dias a 20°C.

Não se verificou qualquer relação do parâmetro indirecto da actividade da enzima fermentativa ADH com o aparecimento de acastanhamento interno nas peras das últimas datas a 20°C (t_{158} e t_{190}), não se suportando a hipótese de que as peras com acastanhamento se encontravam em processo de fermentação mais acentuado. Não foi possível estabelecer uma relação viável entre o acastanhamento interno manifestado no último lote com os parâmetros químicos e bioquímicos analisados, deixando por isso em aberto a realização de mais estudos onde se possam despistar possíveis factores que possam estar associados à origem deste problema.

Assim, na continuidade deste trabalho propõem-se algumas alterações/sugestões.

Para averiguar se a reduzida actividade fermentativa/oxidativa se deve à falta de substrato e/ou de enzima activa nos sumos, poder-se-á no futuro considerar a inclusão de enzimas puras em sumo inactivado, para avaliar o potencial deste como substrato. Será razoável analisar peras com tempos de prateleiras apenas de 0 e 7 dias, uma vez que aos 14 dias as peras já se encontravam num processo de maturação muito avançado.

8. Referências Bibliográficas

- Adams, J.B. 2010. *Effect of enzymatic reactions on color of fruits and vegetables*. In: *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering Applications*. CRC Press, USA, p.19-43.
- AGROTEC, Revista Técnico - Científica Agrícola. 2016. Disponível em: <http://www.agrotec.pt>. Acesso em: 6/09/2017.
- Ahmed, A. E., Labavitch, J.M. 1980. *Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit*. *Plant Physiology*, 65, p.1014-1016.
- Almeida, D. 2005. *Manuseamento de Produtos Hortofrutícolas*. Sociedade Portuguesa da Inovação, Porto, 1ªedição, p. 23-50, 66-78
- Almeida, D., Pintado, M., 2008. *Caracterização nutritiva e funcional de maçã de Alcobaça e da fibra alimentar de pêra 'Rocha' do Oeste*. Consumo de Fruta Qualificada. Seminário AGRO 944, Alcobaça.
- Almeida, D.P.F. 2014. *Gestão de tecnologia na fruticultura portuguesa: teoria e estudo de caso da resposta do sector da pêra 'Rocha' à proibição da difenilamina*. *Actas Portuguesas da Horticultura*, n.23. 3º Simpósio Nacional de Fruticultura, p. 397- 404.
- Almeida, D., Carvalho, R., Dupille, E. 2016. *Efficacy of 1-methylcyclopropene on the mitigation of storage disorders of "Rocha" pear under normal refrigerated and controlled atmospheres*. *Food Science and Technology International*, 22 (5), p. 399 -409.
- Alpalhão, A., Neto, C., Goulão, L., Clemente, J., Henriques, J., Lourenço, I., Oliveira, C.M. 2009. *Efeito do 1-metilciclopropeno em pêra 'Rocha' em diferentes estados de maturação armazenadas em atmosfera normal*. *Actas Portuguesas da Horticultura* n. 11, p. 224 - 230.
- Angelo, P.M., Jorge, N. 2007. *Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão*. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66 (1), p. 1-9.
- ANP, Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha. 2009. *Caderno de Especificações da Pera Rocha D.O.P.*
- ANP, Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha. 2017. *Pera Rocha do Oeste*. Disponível em: <http://www.perarocha.pt/>. Acesso em: 2/08/2017.

- Bradford, M. M., 1976. *A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, vol. 72, p. 248-254.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Shieberle, P. 2009. *Food Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 4ª edição, p. 807-861.
- Brecht, J.K., Saltveit, M.E., Talcott, S. T. Moretti, C.L. 2007. *Alterações metabólicas*. In: *Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças*. Embrapa, Brasília. p. 43-77.
- Brecht, J.K., Saltveit, M. E., Talcott, S.T., Schneider, K. R., Felkey, K., Bartz, J.A. 2004. *Fresh-cut vegetables and fruits*. Horticultural Reviews, v.30, p. 186- 251.
- Cantu, D., Vicente, A.R., Greve, L.C., Dewey, F.M., Bennett, A.B., Labavitch, J.M., Powell, A.L.T. 2008. *The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to Botrytis cinerea*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 105 (3), p. 859–864.
- Castro- Giráldez, M., Fito, P.J., Chenoll, C., Fito, P. 2010. *Development of a dielectric spectroscopy technique for the determination of apple (Granny Smith) maturity*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 11, p.749-754.
- Cheng, G.W., Crisosto, C.H. 1995. *Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 120 (5), p.835-838.
- Coutinho, E. F., Malgarim, M. B., Souza, E.L., Treptow, R. O. 2003. *Qualidade Pós-Colheita da Pêra (Pyrus communis L.) cultivar Carrick submetida a diferentes condições de armazenamento*. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 25, n. 3 p. 417- 420.
- Danieli, F., Costa, L.R.L.G., Silva, L.C., Hara, A.S.S., Silva, A.A.S., 2009. *Determination of vitamin C in sample orange juice in natura and commercial samples of orange juice pasteurized and bottled in Tetra Pak packages*. Rev Inst Ciênc Saúde. 27(4), p.361-365.
- Davey, M.W., Montagu, M.V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, J., 2000. *Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, p. 825–860.
- Degáspari, C. H., Waszczynskyj, N. 2004. *Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos*. Visão Acadêmica, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40.

Deuchande, T., Carvalho, S.M.P., Larrigaudière, C., Fidalgo, F., Guterres, U., Isidoro, N., Vasconcelos, M. 2014. *Atmosfera controlada dinâmica na prevenção do acastanhamento interno em pêra 'Rocha': eficácia dos sensores de etanol e de fluorescência de clorofilas*. Actas Portuguesas da Horticultura (23): 3º Simpósio Nacional de Fruticultura. Vila Real, p. 345-352.

Deuchande, T., Carvalho, S.M.P., Guterres, U., Fidalgo, F., Isidoro, N., Larrigaudière, C., Vasconcelos, M.W. 2016. *Dynamic controlled atmosphere for prevention of internal browning disorders in 'Rocha' pear*. Food Science and Technology, v.65, p.725 – 730.

Escarpa, A., González, M.C. 2001. *Total extractable phenolic chromatographic index: an overview of the phenolic class contents from different sources of foods*. European Food Research and Technology, 212, p.439-444.

Fawole, O. A., Opara, U. L. 2013. *Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. 'Bhagwa')*. South African Journal of Botany, Vol.85, p. 23-31.

Franck, C., Lammertyn, J., Ho, Q.T., Verboven, P., Verlinden, B., Nicolai, B.M. 2007. *Browning disorders in pear fruit*. Postharvest Biology and Technology. 43, p. 1-13.

Galvis -Shánchez, A.C., Morais, A.M.M.B. 2001. *Effects of controlled atmosphere (CA) storage on pectinmethylesterase (PME) activity and texture of 'Rocha' pears*. Journal of the Science of Food and Agriculture, Oxford. v.82 (1), p.143-145.

Galvis- Sánchez, A.C., Fonseca, S.C., Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., Malcata, F. X. 2006. *Effect of different levels of CO₂ on the antioxidant content and the polyphenoloxidase activity of 'Rocha' pears during cold storage*. Journal of the Science of Food and Agriculture, Oxford. v.86 (4), p.509 -517.

Gomes, M.H., Vieira, T., Fundo, J.F., Almeida, D. P.F. 2014. *Polyphenoloxidase activity and browning in fresh-cut 'Rocha' pear as affected by pH, phenolic substrates, and antibrowning additives*. Postharvest Biology and Technology, v.91, p. 32-38.

Goulao, L.F., Oliveira, C.M. 2008. *Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit*. Trends in Food Science and Technology. 19, p. 4-25.

Goulao, L.F., Almeida, D.P., Oliveira, C.M. 2010. *Effect of enzymatic reactions on texture of fruits and vegetables*. In: Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering Applications. CRC Press, USA, p.71-122.

Goulao, L.F., Santos, J., de Sousa, I., Oliveira, C.M. 2006. *Patterns of enzymatic activity of cell wallmodifying enzymes during growth and ripening of apples*. Postharvest Biology and Technology. 43, p. 307-318.

GPP, Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral. 2016. *Ficha de internacionalização: Pera Rocha*.

GPP, Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral. 2017. *Dados Estatísticos: Pera Rocha*.

INSA, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. 2017. *Alimentação e Nutrição - Tabela de Composição de Alimentos*. Disponível em: <http://www.insa.pt/>. Acesso em: 2/08/2017.

INE, Instituto Nacional de Estatística. 2017. *Estatísticas Agrícolas 2016*.

Kader, A.A., Zagory, D., Kerbel, E.L. 1989. *Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol.28, p. 1-30.

Kader, A. A.1992a. *Modified atmospheres during transport and storage*. In: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, University of California 3311, p.85-92.

Kader, A. A. 1992b. *Postharvest Biology and Technology: An Overview*. In *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, University of California 3311, p.15-20.

Kader, A. A. 1999. *Fruit maturity, ripening, and quality relationships*. Acta Horticulturae, 485, p. 203-208.

Ke, D., Mateos, M., Kader, A.A. 1993. *Regulation of fermentative metabolism in fruits and vegetables by controlled atmospheres*. Proceedings from the Sixth International Controlled Atmosphere Research Conference NRAES-71, Cornell University, Ithaca, NY, p. 63-77.

Ke, D., Yahia, E., Mateos, M.,Kader, A.A. 1994. *Ethanollic fermentation of 'Bartlett' pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 119 (5), p. 976–982.

Kupferman, E. 2001. *Controlled atmosphere storage of apples and pears*. WSU Tree Fruit Research & Extension Center. p.1-8.

Larrigaudière, C., Lentheric, I., Puy, J., Pintó, E. 2004. *Biochemical characterisation of core browning and brown heart disorders in pear by multivariate analysis*. Postharvest Biology and Technology, v. 31, p. 29-39.

- Latowski, D., Surówka, E., Strzalka, K. 2010. *Regulatory Role of Components of Ascorbate-Glutathione Pathway of Ascorbate-Glutathione Pathway*. In: Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants. A. Anjum, S. Umar & M. Chan, edits. Springer, London:, p. 1-53.
- Lombardi, S.R.B., Moraes, D.M., Camelatto, D. 2000. *Avaliação do Crescimento e da Maturação Pós-Colheita de Peras da cultivar Shinsseiki*. Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB), Brasília, v.35, n.12, p.2399-2405.
- Lee, S. K., Kader, A. A. 2000. *Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops*. Postharvest Biology and Technology, 20, p. 207- 220.
- Lum, G.B., DeEll, J.R., Hoover, G.J., Subedi, S., Shelp, B.J., Bozzo, G.G. 2017. *1-Methylcyclopropene and controlled atmosphere modulate oxidative stress metabolism and reduce senescence-related disorders in stored pear fruit*. Postharvest Biology and Technology, 129, p. 52-63.
- Lurie, S. 1998. *Postharvest heat treatments*. Postharvest Biology and Technology 14, p. 257- 269.
- Martins, M.M., Empis, J. 2000. *Produtos Hortofrutícolas Frescos ou Minimamente Processados*. Sociedade Portuguesa da Inovação, Porto, p. 13-33.
- Martin, M.S., Steffens, C.A., Amarante, C.V.T., Brackmann, A., Junior, W.L. 2015. *Qualidade de peras 'rocha' armazenadas em atmosfera controlada*. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 37, nº1, p. 73-82.
- Mathew, A.G., Parpia, H.A. 1971. *Food browning as a polyphenol reaction*. Advances in Food Research, vol. 19, p. 75-145.
- Muhammad, I., Ashiru, S., Ibrahim, I., Kanoma, A. I., Sani, I., Garba, S. 2014. *Effect of Ripening Stage on Vitamin C Content in Selected Fruits*. International Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries. 2(3), p. 60-65.
- Ngadze, E., Icishahayo, D., Coutinho, T. A., van der Waals, J. E. 2012. *Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot*. Plant Disease, vol. 96, p.186-192.
- Nogueira, J.N. 1973. *Influência de alguns métodos de controle do escurecimento enzimático nas propriedades organolépticas da maçã Bruckner do Brasil conservada por congelação e liofilização*. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, vol. 30, p. 375- 386.

Norma Portuguesa Definitiva (NP- 1421). 1977. *Géneros Alimentícios derivados de frutos e produtos hortícolas: determinação da acidez*.

Oliveira, C.M., Garcia, A., Mota, M., Alpalhão, A. 2014. *Qualidade da pêra 'Rocha': efeito do tempo de prateleira na textura e na preferência do consumidor* 14. Actas Portuguesas da Horticultura (23): 3ºSimpósio Nacional de Fruticultura. Vila Real. p. 353-358.

Oliveira, R. G., Godoy, H.T., Prado, M.A., 2010. *Optimization of a colorimetric method to determine ascorbic acids in fruit jelly*. Ciênc. Tecnol. Aliment. 30(1): 244-249.

Pedreschi, R., Hertog, M., Robben, J., Noben, J.P., Nicolai, B. 2008. *Physiological implications of controlled atmosphere storage of 'Conference' pears (Pyrus communis L.): A proteomic approach*. Postharvest Biology and Technology, 50, p. 110–116.

Pinto, P.M.Z, Morais, A.M.M.B. 2000. *Boas práticas para a conservação de produtos hortofrutícolas*. Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica. 1ª edição, p. 16-26.

Pintó, E., Lenthéric, I., Vendrell, M., Larrigaudière, C. 2001. *Role of fermentative and antioxidant metabolisms in the induction of core browning in controlled-atmosphere stored pears*. Journal of the Science of Food and Agriculture 81, p. 364-370.

Pisoschi, A.M., Danet, A.F., Kalinowski, S., 2008. *Ascorbic Acid Determination in Commercial Fruit Juice Samples by Cyclic Voltammetry*. Journal of Automated Methods and Management in Chemistry, p. 1-8.

Racker, E. 1955. *Alcohol Dehydrogenase from Baker's Yeast: $RCH_2OH + DPN^+ \rightleftharpoons RCHO + DPNH + H^+$* . In: *Methods in Enzymology*. Academic Press inc. Publishers, New York, vol. 1, p. 500-503.

Ribeiro, E.P., Seravalli, E.A.G. 2007. *Química de Alimentos*. Instituto Mauá de Tecnologia, 2ª edição, São Paulo, p. 179-181.

Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. 1999. *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*. Food Chemistry, 66, p. 401-436.

Saba, M.K., Moradi, S. 2016. *Internal browning disorder of eight pear cultivars affected by bioactive constituents and enzyme activity*. Food Chemistry, 205, p. 257-263.

Salta, J., Martins, A., Santos, R.G., Neng, N.R., Nogueira, J.M. F., Justino, J., Rauter, A.P. 2010. *Phenolic composition and antioxidant activity of Rocha pear and other pear cultivars – A comparative study*. Journal of Functional Foods 2, p.153–157.

Saltveit, M. E. 1999. *Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables*. Postharvest Biology and Technology, 15 (3): 279-292.

Saquet, A.A., Streif, J., Almeida, D.P.F. 2017. *Responses of 'Rocha' pear to delayed controlled atmosphere storage depend on oxygen partial pressure*. Scientia Horticulturae 222, p. 17-21.

Saquet, A., Almeida, D. 2017. *Internal disorders of 'Rocha' pear affected by oxygen partial pressure and inhibition of ethylene action*. Postharvest Biology and Technology 128, p. 54-62.

Saquet, A.A., Streif, J., Bangerth. 2003. *Energy metabolism and membrane lipid alterations in relation to brown heart development in 'Conference' pears during delayed controlled atmosphere storage*. Postharvest Biology and Technology, vol. 30 (2), p. 123-142.

Saquet, A. A., Almeida, D. P. F. 2016. *Ripening physiology and biochemistry of 'Rocha' pear as affected by ethylene inhibition*. Postharvest Biology and Technology 125, p. 161- 167.

Sigrist, J.M.M. 2002. *Estudos fisiológicos e tecnológicos de couve-flor e rúcula minimamente processadas*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.

Silva, P.T., Fialho, E., Miguel, M.A.L., Lopes, M.L.M., Valente-Mesquita, V.L., 2007. *Estabilidades química, físico-química e microbiológica se suco de laranja cs. "Pêra" submetido a diferentes condições de estocagem*. Curitiba v. 25, n. 2, p. 235-246.

Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A.V., Vilas Boas, L. 2006. *Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Olea europaea L. Fruits and Leaves*. Food Science and Technology International, 12(5), p. 385- 396.

Silva, F.J.P., Gomes, M.H., Fidalgo, F., Almeida, D.P.F. 2009. *Influência da atmosfera controlada diferida na actividade antioxidante e acastanhamentos internos da pêra 'Rocha'*. Actas Portuguesas da Horticultura n. 1, p. 198 - 205.

Soares, S. E. 2002. *Ácidos fenólicos como antioxidantes*. Revista de Nutrição, Campinas, 15 (1), p. 71-81.

Sousa, C.M.M., Silva, H.R., Vieira, M.G., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D, Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M.H., 2007.

Fenóis totais e actividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, vol. 30, n. 2, p. 351-355.

Toivonen, P.M.A., Brummell, D.A. 2008. *Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables*. Postharvest Biology and Technology, 48 , p. 1–14.

Veltman, R. H. 2002. *On the origin of internal browning in pears (Pyrus communis L. cv Conference)*. Wageningen Universiteit, Wageningen.

Veltman, R.H., Kho, R. M., Schaik, A.C.R., Sanders, M.G., Oosterhaven, J. 2000. *Ascorbic acid and tissue browning in pears (Pyrus communis L. cvs Rocha and Conference) under controlled atmosphere conditions*. Postharvest Biology and Technology 19, p. 129 – 137.

Villalobos- Acuña, M., Mitcham, E. J. 2008. *Ripening of European pears: The chilling dilemma*. Postharvest Biology and Technology 49, p. 187- 200.

Watada, A. E., Abe, K., Yamuchi, N. 1990. *Physiologic activities of partially processed fruits and vegetables*. Food Technology, 44 (5): 116-122.

Waterhouse, A. L. 2003. *Determination of Total Phenolics*. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. I1.1.1-I1.1.1.

Wills, R.B.H., Graham, D., Lee, T.H., Hall, E.G.1989. *Postharvest. An introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables*. BSP Professional Books, Hong Kong.

Wills, R., McGlasson, B., Graham, D. & Joyce, D., 2007. *Postharvest*, 5ªedição, CABI, Australia, 227pp.

Wonsawat, W. 2014. *Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) in Orange Juices Product*. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 8 (6), p.623-625.

Yoruk, R., Marshall, M.R. 2003. *Physicochemical properties and function of plant polyphenoloxidase: a review*. Journal of Food Biochemistry, 27, p. 361-422.

ANEXOS

ANEXO I - Procedimento experimental detalhado

Para cada lote de 30 peras (15 peras do pomar do Bombarral e 15 peras de Maфра), em que cada pêra representa uma amostra, foram feitas as seguintes análises.

A. Determinação da firmeza

1. Com auxílio de uma “faca” ou “raspador” retirar a epiderme da pêra, de dois lados opostos, na região equatorial da pêra;
2. Encostar o penetrómetro (FT-327) perpendicularmente à pêra e pressioná-lo firmemente até que o pericarpo seja perfurado. Quando a ponta de prova perfura a pêra até ao traço, faz-se a leitura da firmeza ($\text{kg}/0.5 \text{ cm}^2$).

B. Preparação do sumo

1. Pesa-se cada fruto, seguidamente este é cortado e colocado na liquidificadora até obtenção de um sumo;
2. Colocam-se as amostras de sumo em tubos de ensaio identificados, perfazendo não mais de 50 mL de sumo em cada tubo. De seguida colocam-se os tubos em caixas com gelo para se manterem frescos;
3. Procede-se depois à centrifugação na centrífugadora (Hermle Z 383 K) das amostras durante 10 min, à velocidade de 5000 rpm (raio = 0,6), a uma temperatura de 4°C;
4. Faz-se de seguida uma decantação para separar a polpa do sumo, e coloca-se o sumo num novo tubo de ensaio previamente identificado e datado. Repete-se para as restantes amostras. Os sumos mantiveram-se congelados até realização de análises.

C. Determinação do Teor de Sólidos Solúveis

1. Calibra-se o refractómetro (modelo HI 96801) com água destilada (amostra branco);
2. Com uma micropipeta retira-se cerca de 1 mL do sumo clarificado, e coloca-se uma pequena quantidade sobre a célula do refractómetro e faz-se a sua leitura (°Brix);

3. No fim de cada medição limpa-se a célula com água destilada.

D. Determinação da vitamina C

1. Colocar em goblés de 10 mL, 500 μ L de sumo da amostra a analisar, e, 1500 μ L de água destilada, perfazendo um volume total de 2000 μ L de solução;
2. Pesar o conjunto do goblé + sumo diluído;
3. Adicionam-se gotas da solução de DCPIP com uma micropipeta ao sumo diluído, até que este mude de cor (quando atinge o ponto de equivalência);
4. Pesa-se novamente o conjunto (goblé + sumo);
5. Determina-se a massa de DCPIP adicionada;
6. De seguida é feita uma solução padrão: coloca-se num goblé de 10 mL, 20 μ L de uma solução padrão de Vitamina C e 1980 μ L de água destilada, perfazendo um volume total de 2000 μ L (diluição de 1:100); Pesa-se o conjunto goblé + padrão de ácido ascórbico. Adiciona-se gota a gota com uma micropipeta, a solução de DCPIP até se atingir o ponto de equivalência, em que a solução incolor passa a azul; Pesa-se novamente o conjunto (goblé + ácido ascórbico com DCPIP); faz-se a diferença de pesos obtidos, determinando-se a massa de DCPIP gasta para titular o padrão de ácido ascórbico.

Solução Padrão de Vitamina C

1. Pesa-se 29 mg de ácido ascórbico (em pó);
2. Dilui-se em 2 mL de água destilada.
3. Congela-se a solução padrão.

Solução 2,6- diclorofenolindofenol (DCPIP)

1. Pesar 29 mg de 2,6- diclorofenolindofenol (DCPIP) e diluir em 20 mL de água destilada;
2. De seguida fazer uma diluição de 1:10 (10 mL da solução DCPIP e 90 mL de água esterilizada);
3. Colocar num frasco de 100 mL, devidamente identificado, a solução final de DCPIP.

E. Determinação do teor de fenóis

1. Colocar em cada *cuvette* de metacrilato 150 μL de sumo da amostra a analisar e 2850 μL de água destilada (diluição de 1:20), perfazendo um volume total de 3000 μL de solução;
2. Preparação do branco: colocar 3000 μL de água destilada numa *cuvette* de metacrilato;
3. Efectuar a leitura no espectrofotómetro (modelo GeneQuant Pro) da absorvância do branco, primeiro, e de seguida para cada amostra, no comprimento de onda de 280 nm, no espectrofotómetro;
4. A concentração de fenóis totais expressa em equivalentes de ácido gálico foi determinada com recurso a uma recta de regressão previamente estabelecida no laboratório, cuja equação é $y=483,09x + 34,01$, onde y é a concentração de ácido gálico (mg/L) e x a absorvância a 280 nm ($R^2= 0.9992$).

F. Determinação da acidez titulável

1. Calibrar o potenciómetro com o eléctrodo (modelo pH 213), para dois valores de pH (4 e 7) utilizando as soluções de calibração de pH 7 e pH 4. Colocar a sonda de temperatura e o eléctrodo num goblé com água destilada;
2. Colocar a solução de NaOH 0,1N na bureta de 25 mL. Anotar o volume inicial;
3. Num goblé diluir 10 mL de sumo da amostra a analisar com 10 mL de água destilada, perfazendo um volume total de 20 mL (diluição de 1:2). (Nota: Quando uma amostra não tem volume suficiente dilui-se uma quantidade menor de sumo e perfaz-se o volume de 20 mL com água destilada, contabilizando-se depois esta diluição nos cálculos).
4. Titula-se com a solução de NaOH 0,1N, até que a solução atinja um pH igual a 8,15. Anota-se o volume final de NaOH gasto e calcula-se o teor de ácidos expressos em equivalentes de ácido málico pela equação $y = 0,67x$, em que y é a concentração de ácido málico (expressa em g/L de sumo) e x o volume total de titulante adicionado.

Solução de NaOH 0,1N

1. Colocar uma ampola de NaOH (em pó) num balão volumétrico de 1000 mL, perfazendo os 1000 mL com água esterilizada, obtendo uma solução de NaOH 0,1 N;

2. Tapar o balão volumétrico e agitar;
3. Colocar a solução num frasco de 1L devidamente identificado e armazenar em ambiente refrigerado (4-8°C).

G. Quantificação de Proteína – Método de Bradford

1. Centrifugar previamente os tubos de sumo a 8000 rpm durante 10 min, a 4°C;
2. Pipetar para cada tubo *eppendorf* 20 µL de sumo, identificar os *eppendorfs* com o respectivo número da amostra;
3. Adicionar a cada *eppendorf* 1000 µL de solução de Bradford e agitar;
4. Identificar a *cuvette* para cada tubo e colocar a respectiva reacção;
5. Preparar as diluições para obter a Curva padrão para quantificação de proteína: preparar 7 diluições de 20 µL com diferentes concentrações (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 e 0.6 mg mL⁻¹) a partir de uma solução *stock* de BSA já preparada de concentração 1.4 mg mL⁻¹;
6. Colocar cada solução numa *cuvette*, sendo a primeira o branco (0 mg/ mL BSA);
7. Proceder à leitura da absorvância a 595 nm no espectrofotómetro (modelo GeneQuant Pro), começando pelo branco, depois as soluções da curva padrão e por fim as amostras.

Solução de Bradford

1. Pesar 100 mg de Coomassie e colocar num balão de Erlenmeyer de 1000 mL;
2. Com uma proveta juntar 50 mL de etanol a 95% e agitar durante 10 min até dissolver;
3. Na *hotte* adicionar 100 mL de ácido fosfórico a 85% e 800 mL de água destilada;
4. Com um funil passar a solução para um balão volumétrico de 1000 mL e perfazer com água destilada;
5. Filtrar a solução com papel de filtro para um frasco de 1000 mL;
6. Colocar papel de alumínio à volta e identificar frasco;
7. Armazenar em meio refrigerado (4-8°C).

H. Determinação indirecta da actividade da Polifenoloxidase (PPO)

1. Transferir 250 μL de sumo, 725 μL de tampão de fosfato de sódio (pH=6) 0,05 M e 250 μL de catecol 0,1 M para o respectivo *ependorf* identificado;
2. Preparar 2 brancos, substituindo o sumo por água;
3. Agitar a solução no *ependorf* e colocar em *cuvette*;
4. Medir a absorvância a 546 nm para diferentes tempos: 0, 5, 10, 17, 40, 60 e 90 minutos, no espectrofotómetro (modelo UV-1200), à temperatura ambiente.

Solução de Catecol 0,1 M (Para cada 30 amostras) (preparação em fresco)

1. Pesar 119 mg de catecol na balança de precisão e juntar 10,82 mL de água destilada com uma micropipeta num tubo de vidro;
2. Agitar até dissolver o catecol.

Solução de Fosfato de Sódio 1M

1. Tarar um goblé de 100 mL e pesar 11,998 g de NaH_2PO_4 com a ajuda de uma espátula, colocar 50 mL de água destilada com uma proveta e agitar;
2. Colocar no agitador magnético com o íman, durante uns minutos até dissolver;
3. Colocar a solução num balão volumétrico de 100 mL e perfazer os 100 mL com água destilada. Tapar e agitar;
4. Coloca-se a solução num frasco identificado e com data;
5. Repetir o procedimento para fazer uma solução de Na_2HPO_4 mas utilizado 14,2 g de Na_2HPO_4 ;
6. Num novo frasco de 100 mL, juntar 87,7 mL da solução preparada de NaH_2PO_4 e 12,3 mL da solução de Na_2HPO_4 , com provetas, até obter 100 mL de tampão fosfato de pH 6. Identificar o frasco com “Tampão Fosfato Sódio 1M”;
7. Num balão de Erlenmeyer de 500 mL colocar 25 mL de tampão fosfato 1M, e perfazer com água destilada (diluição 1:20). Agitar para misturar;
8. Num frasco de 500 mL previamente esterilizado no autoclave, colocar a nova solução de tampão fosfato 0,05 M pH 6.

I. Determinação indirecta da álcool desidrogenase (ADH)

1. Em *ependorfs* de 1 mL previamente identificados colocar com micropipetas: 800 μL de MES 100 mM (pH 6,5), 50 μL de NADH 1,6 mM, 50 μL de acetaldeído 80 mM e 100 μL de sumo;

2. Fazer o mesmo procedimento para preparar 2 amostras branco, substituindo a quantidade de sumo por água destilada;
3. Agitar os *eppendorfs* com as soluções;
4. Colocar 1 mL de cada solução anterior em *cuvette* de metacrilato e 2 mL de água destilada (diluição de 1:3);
5. Proceder à leitura da absorvância a 340 nm no espectrofotómetro (Shimadzu UV-1200) com intervalos de 1h entre cada leitura, durante 4 horas, à temperatura ambiente verificando-se a diminuição da absorvância devido à oxidação do NADH.

MES solução tampão pH=6,5 0,1M

1. Pesar e colocar 21,722 g de base ($C_6H_{12}NNaO_4S$) num balão volumétrico de 100 mL e perfazer com água destilada até 100 mL. Agitar e colocar num frasco de 100 mL identificado;
2. Pesar e colocar 21,3255 g de ácido ($C_6H_{13}NO_4S \cdot xH_2O$) noutro balão volumétrico e perfazer até 100 mL com água destilada. Agitar e colocar num frasco de 100 mL;
3. Retirar para um balão volumétrico de 500 mL, 13,45 mL de solução ácido, 36,55 mL de solução base. Perfazer até 500 mL com água destilada;
4. Esterilizar o frasco com a solução de MES de 500 mL no autoclave;
5. Filtrar a solução com uma membrana com 0,2 μm , com a ajuda de uma seringa, para o frasco esterilizado;
6. Colocar o frasco em meio refrigerado.

Solução de NADH 1,6 mM

1. Dissolver 113,50 mg de NADH em 10 mL de NaOH 0,01 N e diluir com 90 mL de água esterilizada;
2. Colocar a solução de NADH num frasco de 100 mL em meio refrigerado.

Solução de acetaldeído 80 mM

1. Num tubo colocar 1710,3 μL de água destilada e 89,7 μL de uma solução de acetaldeído a 98%, perfazendo um volume de 1800 μL ;
2. Fazer uma diluição de 1:10, e agitar;
3. Manter em meio refrigerado.